**OBTENÇÃO E USO DE MUTANTES COM ALTERAÇÕES NO BALANÇO
AUXINA/CITOCININA NO ESTUDO DA COMPETÊNCIA ORGANOGENICA EM
MICRO-TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

LILIAN ELLEN PINO-NUNES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2005

**OBTENÇÃO E USO DE MUTANTES COM ALTERAÇÕES NO BALANÇO
AUXINA/CITOCININA NO ESTUDO DA COMPETÊNCIA ORGANOGENICA EM
MICRO-TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

LILIAN ELLEN PINO-NUNES

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro – 2005

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

Pino-Nunes, Lilian Ellen

Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) / Lilian Ellen Pino-Nunes. - - Piracicaba, 2005.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Auxinas 2. Citocininas 3. Hormônios vegetais 4. Linhagens vegetais 5. Mutação genética 6. Regeneração "in vitro" 7. Tomate I. Título

CDD 635.642

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

Ao meus pais Caetano e Frederica,
pelo apoio incondicional e pelo carinho dedicado

OFEREÇO

Ao meu marido Alexandre,
pelo amor, companheirismo e compreensão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Especialmente a Deus, pela vida e saúde.

Ao Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres, pela dedicada orientação, pela amizade e paciência, pelo exemplo e apoio durante a realização deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo (proc. 02/10653-7).

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gallo, pela utilização da casa de vegetação do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC).

Ao Prof. Dr. Antonio V.O. Figueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela avaliação e sugestões dadas a este trabalho.

Aos professores Murilo Melo, Ricardo A. Kluge e Beatriz Apezatto da Glória pelas atividades e progressos realizados no Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, e também pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, pela oportunidade dada na realização da monitoria na disciplina Fisiologia Vegetal e pelo aprendizado.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), e à secretária do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Solizéte, pela amizade e eficiência profissional.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, Joni, Simone, Rogério, Agustin, Joanne e Fernando, pelo trabalho em equipe, pelo apoio e ajuda, e especialmente pela amizade.

Ao técnico do laboratório, Romeu, por toda ajuda na realização e condução dos experimentos.

Aos amigos do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Flávio, Paty Gaya, Henrique, Carol, Flávia, Gregori e Baguiña.

À amiga Márcia Cristina Calixto, por todo incentivo e cooperação no início deste trabalho, e pela amizade.

Às amigas Fernanda, Lorene, Keise, Ellen e Joceli, e aos amigos Eduardo, Miguel, Adailton, André e Rodrigo, por todos os anos de amizade e por todos os momentos compartilhados.

À amiga Susana, pela amizade verdadeira, pela força e cumplicidade, mesmo de longe.

Ao amigo Cláudio Leal, por todos os conselhos e orientações dadas, e por me incentivar na luta contra os obstáculos que a vida põe em nossos caminhos.

Ao meu irmão Wilians e ao meu sobrinho Guilherme, os quais fazem parte da minha vida de uma maneira muito especial.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A importância do balanço auxina/citocinina para o desenvolvimento	3
2.2 Auxinas	6
2.2.1 Mutantes em Auxinas	8
2.3 Citocininas	10
2.3.1 Mutantes em Citocininas	13
2.4 Competência para regeneração <i>in vitro</i>	16
2.5 Micro-Tom como modelo fisiológico	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material Vegetal	20
3.2 Cultivo em casa de vegetação	21
3.3 Cruzamentos	22
3.4 Coleta e processamento das sementes	22
3.5 Seleção dos mutantes	23
3.5.1 Mutantes <i>dgt</i>	23
3.5.2 Mutantes <i>brt</i>	24
3.5.3 Mutantes <i>lutescent</i>	24
3.5.4 Mutantes <i>gf</i>	25

3.5.5 Mutantes <i>ls</i>	25
3.5.6 Mutantes <i>bu</i>	25
3.6 Caracterização dos mutantes	27
3.7 Teste da capacidade de regeneração <i>in vitro</i>	28
3.7.1 Cultivo <i>in vitro</i>	28
3.7.2 Teste de regeneração	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Otimização do processo de seleção dos mutantes	29
4.2 Obtenção e caracterização dos micro-mutantes	30
4.2.1 Teste de sensibilidade à auxina	38
4.2.2 Teste de sensibilidade à citocinina	39
4.2.3 Teste de sensibilidade ao etileno	43
4.2.4 Obtenção de um mutante em auxina no porte micro	46
4.2.5 Obtenção de um mutante em citocinina no porte micro	46
4.3 Testes de regeneração <i>in vitro</i> de um mutante em auxina e um mutante em citocinina	49
4.3.1 Regeneração a partir de segmentos de hipocótilo	49
4.3.2 Regeneração a partir de explantes cotiledonares	50
4.3.3 Regeneração a partir de segmentos de raiz	51
4.4 O papel do balanço auxina/citocinina na competência para regeneração	54
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

MT = Micro-Tom

dgt = mutante *diageotropica*

brt = mutante *bushy root*

l = mutante *lutescent*

gf = mutante *green flesh*

ls = mutante *lateral suppressed*

bu = mutante *bushy*

AIA = Ácido Indolil-3-Acético

AIA/Cks = balanço auxina/citocinina

TDZ = Thidiazuron

**OBTENÇÃO E USO DE MUTANTES COM ALTERAÇÕES NO BALANÇO
AUXINA/CITOCININA NO ESTUDO DA COMPETÊNCIA ORGANOGENICA EM
MICRO-TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

Autor: LILIAN ELLEN PINO-NUNES

Orientador: Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

RESUMO

Uma das abordagens mais utilizadas atualmente para se estudar o metabolismo e a transdução de sinais hormonais é o uso de mutantes com alterações nos genes que codificam os principais componentes desses processos. A cultivar miniatura de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) denominada Micro-Tom (MT) possui porte reduzido (8 cm) e ciclo de apenas 75 dias, constituindo-se em um excelente modelo para uma abordagem genética de estudos fisiológicos. Mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina, ou na capacidade de resposta a esse balanço, podem ser utilizados para desvendar o papel da interação entre esses hormônios no controle do desenvolvimento, inclusive no que se refere à capacidade de regeneração *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo criar um modelo para se estudar o papel do balanço auxina/citocinina endógeno na competência para regeneração *in vitro*, através da incorporação das mutações *dgt*, *brt*, *gf*, *lutescent*, *ls* e *bu*, as quais sugerem alterações no metabolismo e/ou sensibilidade hormonal, na cultivar MT. Essas mutações foram caracterizadas quanto à sensibilidade à auxina e citocinina através da obtenção de curvas de dose-resposta, utilizando-se diferentes concentrações de AIA (0; 0.1; 1; 10 e 100 μ M) e TDZ (0; 0.01; 0.1; 1; 10 e 100 μ M), em segmentos de pecíolo e

plântulas germinadas em gerbox, respectivamente. As mutações caracterizadas para auxina e citocinina, bem como o controle MT, foram testadas *in vitro*, quanto à sua capacidade de regeneração, em meio de cultura MS, suplementado com 5 μ M de BAP (explantes cotiledonares e segmentos de hipocótilo) e 4,5 μ M de Zeatina (segmentos de raiz). Os mutantes *lutescent*, *gf* e *bu*, apesar de possuírem fenótipo bastante interessante, não parecem ser relacionados à sensibilidade à auxina e citocinina, bem como ao etileno. Já os mutantes *dgt* e *brt* apresentaram respostas típicas de mutantes com pouca sensibilidade à auxina e citocinina, respectivamente. Dessa forma, a resposta ao balanço AIA/Cks é alterado nesses mutantes, afetando o processo de regeneração. Nos segmentos de hipocótilo, houve formação de calos em todos os explantes, entretanto, poucos explantes formaram gemas adventícias, sendo que o mutante *dgt* foi o que apresentou menor taxa de regeneração. Nos explantes cotiledonares, a taxa de regeneração foi menor ainda no MT e no mutante *dgt*, e ausente no mutante *brt*. Não houve regeneração em nenhum dos genótipos em segmentos de raiz. Esses resultados sugerem que, embora a competência para regeneração *in vitro* possa ser dependente do balanço AIA/Cks, ou da resposta a esse balanço, existem interações mais complexas entre esses hormônios e seus efeitos na regeneração. A exemplo disso, era de se esperar uma maior formação de gemas caulinares em *dgt*, já que sua capacidade de resposta ao balanço está voltada para Cks. Um estudo mais aprofundado para a correta interpretação dessa interação deve levar em conta que a sensibilidade à auxina é necessária também no processo de desdiferenciação. Além disso, auxinas e citocininas não só atuam na diferenciação, mas também podem interferir na regeneração, independente do balanço AIA/Cks, já que são necessárias para a expansão e divisão celular.

**GENERATION AND UTILIZATION OF MUTANTS WITH ALTERED
AUXIN/CYTOKININ RATIO IN THE STUDY OF ORGANOGENIC COMPETENCE
IN MICRO-TOMATO (*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

Author: LILIAN ELLEN PINO-NUNES

Adviser: Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

SUMMARY

To date, one of approaches more used to study the metabolism and transduction of hormone signals are the mutants with alterations in genes which encode the principal components of this process. The miniature cultivar of tomato (*Lycopersicon esculentum*) named Micro-Tom (MT) possesses reduced size (8 cm) and a life cycle of just 75 days, constituting an excellent model for a genetic approach of physiology studies. Mutants with altered auxin/cytokinin ratio, or in the response capacity to this ratio, can be used to clear up the role of interactions between these hormones in the control of development, including those concerning the *in vitro* regeneration capacity. The current work aimed to produce a model to study the role of endogenous auxin/cytokinins ratio in the competence for *in vitro* regeneration, through incorporation of the *dgt*, *brt*, *gf*, *lutescent*, *ls* and *bu* mutations, which concern altered hormone metabolism and/or sensibility, in the MT cultivar. These mutations were tested for the hypothesis of being related to auxin and cytokinin sensibility by means of dose-response curves, using different concentrations of IAA (0; 0.1; 1; 10 e 100 μ M) and TDZ (0; 0.01; 0.1; 1; 10 e 100 μ M), in petiole segments and gerbox-germinated seedlings, respectively. The mutations confirmed to be auxin and cytokinin related, as

well the MT control, were tested *in vitro* for regeneration capacity, in MS culture media, with either 5 μ M de BAP (cotyledon explants and hypocotyl segments) or 4,5 μ M Zeatin (root segments). The *lutescent*, *gf* and *bu* mutants, despite showing an interesting phenotype, do not seem to be related to auxin and cytokinin sensibility, as well as to ethylene. However, the *dgt* and *brt* mutants showed typical responses of reduced auxin and cytokinin sensibility, respectively. Thus, the response to auxin/cytokinin is altered in these mutants, affecting the regeneration process. Calli were observed in all hypocotyl segments, however few explants formed adventitious buds, with the *dgt* mutant presenting the least regeneration ratio. In the cotyledon explants, the regeneration ratio was even less than in MT and in *dgt*, and absent in the *brt* mutant. There was no regeneration whatsoever from root segments in any genotype. These results suggest that, although the competence for *in vitro* regeneration might be dependent on the IAA/Cks ratio, or the response to this ratio, interactions far more complex exist between these hormones and their effects on regeneration. For instance, a greater adventitious buds formation was expected in *dgt*, because its response ability is biased toward Cks. A deeper study for the correct interpretation of these data should consider that the sensibility to auxin is also necessary in the process of undifferentiation. Besides, both auxins and cytokinins have roles not only in differentiation, but also can interfere with regeneration independent of the IAA/Cks ratio, as they are required for cell division and expansion.

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios vegetais são de grande importância para o desenvolvimento das plantas. As auxinas e citocininas controlam diversas etapas do desenvolvimento, desde a divisão (Das et al., 1956; Zhang et al., 1996), expansão (Cleland, 1995) e diferenciação celular (Skoog & Miller, 1957) até o amadurecimento de frutos e senescência (Hong & Lee, 1993; Balbi & Lomax, 2003). Além disso, esses hormônios são essenciais para a regeneração de plantas *in vitro* (Skoog & Miller, 1957).

O uso de mutantes para estudos de desenvolvimento tornou-se uma ferramenta muito importante, a qual tem sido amplamente utilizada nos últimos anos (Kendrick & Kronenberg, 1994). Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é possível encontrar mutantes que apresentam baixa sensibilidade aos hormônios auxina e citocinina, como o *dgt* (Hicks et al., 1989) e o *brt*, respectivamente, e alterações na resposta à giberelina, como o *ls* (Schumacher et al., 1999).

O tomateiro pode ser usado também como um modelo para estudos em cultura de tecidos, devido à alta capacidade de regeneração por hipocótilo e cotilédones (Lipucci di Paola et al., 1983). O balanço AIA/Cks é essencial para a aquisição de competência dos explantes durante o processo organogênico (Peres, 2002).

O presente trabalho teve como objetivos a obtenção de linhagens de tomateiro contendo as mutações *dgt*, *brt*, *lutescent*, *gf*, *ls* e *bu*, através da introgressão dessas mutações na cultivar Micro-Tom, realização de testes de capacidade de regeneração nas linhagens obtidas e caracterização dos mutantes quanto à sensibilidade aos hormônios auxina e citocinina. A cultivar Micro-Tom foi recentemente proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético, e produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-150ml de substrato, completando seu ciclo de vida em 70-90 dias.

A obtenção dessas linhagens no porte micro possibilitou estudos sobre o papel da auxina e citocinina nos processos de regeneração *in vitro*, bem como a complexa interação entre esses hormônios no desenvolvimento da planta como um todo. A partir dessas linhagens, outros estudos fisiológicos poderão ser realizados no sentido de se investigar a interação de auxinas e citocininas com outros hormônios, como etileno e giberelina. O desenvolvimento e a otimização dos processos de triagem aqui citados podem facilitar a seleção e caracterização de novos mutantes hormonais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância do balanço auxina/citocinina para o desenvolvimento

O desenvolvimento vegetal é caracterizado principalmente pelo fato dele ser pós-embriônico, ou seja, a maior parte do desenvolvimento se dá ao longo do ciclo de vida do vegetal com a formação contínua de órgãos, tais como caules, raízes, folhas, flores e frutos (Fosket, 1994). As plantas mantêm os meristemas apicais caulinar e radicular durante toda sua vida, e essa característica possibilita uma organogênese continuada. As auxinas e citocininas controlam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e, portanto, no tipo de órgão a ser formado (Skoog & Miller, 1957). Ao contrário das auxinas, normalmente associadas à indução de raízes, um balanço AIA/Cks favorável às citocininas induz gemas caulinares tanto *in vitro* (Mercier et al., 2003; Banno et al., 2001; Peres & Kerbauy, 1999) quanto *ex vitro* (Estruch et al., 1991). Existem consideráveis evidências de que esse efeito diferencial de auxinas e citocininas na indução de caules e raízes é importante para um desenvolvimento integrado do vegetal. Desse modo, as citocininas produzidas nas raízes podem induzir a formação de caules e esses são centros produtores de auxina, necessária à formação de mais raízes. O crescimento integrado e equilibrado entre caules e raízes é importante, pois esses órgãos possuem funções complementares na sobrevivência do vegetal (Peres & Kerbauy, 2004).

Estudos com hormônios exógenos, ou seja, aplicados aos tecidos, evidenciam que o balanço AIA/Cks controla o desenvolvimento vegetal (Skoog & Miller, 1957). Porém, a falta de conhecimento quanto à capacidade de absorção, transporte e inativação do tecido no qual o hormônio foi aplicado e as alterações que o hormônio exógeno pode provocar no nível hormonal endógeno são algumas limitações quanto à

correta interpretação desses estudos. Atualmente, duas abordagens têm sido empregadas para sobrepor essas limitações. Uma delas é a dosagem do conteúdo hormonal endógeno nos tecidos (Peres et al., 1997), utilizando-se técnicas como HPLC ("High Performance Liquid Chromatography") e o uso de anticorpos em ensaio do tipo ELISA ("Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"), além de espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa ou ao HPLC (Horgan & Scott, 1987). A outra é através do uso de plantas transgênicas nas quais se introduziram genes que alteram o metabolismo ou a sensibilidade hormonal (Peres & Kerbauy, 2004).

As primeiras plantas transgênicas com alterações no balanço AIA/Cks foram resultantes da introdução do gene *ipt* de *Agrobacterium*. Esse gene foi introduzido utilizando diferentes promotores (Medford et al., 1989; Schmülling et al., 1989; Smigocki, 1991; Li et al., 1992; Ainley et al., 1993), o que causou uma certa variação no fenótipo de cada tipo de transgênico. As características mais comumente encontradas em tais plantas foram a inibição da formação de raízes e a perda de dominância apical, devido a uma maior formação de gemas caulinares axilares. A não formação de raízes em plantas transgênicas expressando o gene *ipt*, sobretudo naquelas onde esse gene foi ligado a um promotor forte (35S de CaMV), obrigava a enxertia das plantas transgênicas sobre plantas normais. Em outros estudos, o gene *ipt* foi fundido com promotores induzidos para que as citocininas passassem a ser produzidas somente quando se desse um estímulo (Schmülling et al., 1989; Li et al., 1992). Nesses estudos, plantas transgênicas crescendo sem ter o estímulo para expressão de *ipt* apresentaram fenótipo normal e inclusive não necessitaram mais ser enxertadas para que tivessem um sistema radicular.

A ação hormonal, sobretudo o efeito do balanço AIA/Cks no desenvolvimento depende do estabelecimento de gradientes espaciais e temporais. Os principais responsáveis pelo estabelecimento desses gradientes seriam as peculiaridades de síntese e transporte, além das enzimas de inativação de citocininas. Os primeiros genes responsáveis pela inativação de citocininas foram isolados em 1999 (Houba-Hérin et al., 1999; Martin et al., 1999a; 1999b). O isolamento de tais genes abriu a possibilidade de se alterar o conteúdo endógeno de citocininas de um modo inverso ao que já havia sido feito utilizando-se o gene *ipt*. Nesse sentido, tabaco transgênico superexpressando o

gene para citocinina oxidase mostrou pela primeira vez o fenótipo de plantas com níveis reduzidos de citocininas. Esse ineditismo se deve ao fato de que, de modo diferente de outros hormônios, não existem inibidores efetivos da biossíntese ou ação de citocininas (Peres & Kerbauy, 2004). As referidas plantas mostraram-se anãs como consequência de um retardamento severo do desenvolvimento do caule, incluindo a presença de entrenós curtos, folhas lanceoladas e epinásticas e redução da dominância apical. Em contraste, o crescimento do sistema radicular foi aumentado, sendo que o número de raízes laterais e adventícias cresceu, o alongamento das raízes primárias foi mais rápido e primórdios das raízes laterais foram notados próximos do ápice radicular (Werner et al., 2001). Uma outra maneira de se diminuir o conteúdo endógeno de citocininas seria através da superexpressão de genes para as enzimas que conjugam citocininas ativas. Isso foi demonstrado com plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *35S::ZOG1*, as quais formaram raízes aéreas nos caules durante as primeiras duas semanas crescendo sob alta umidade. Além disso, essas plantas também apresentaram reduzida dominância apical e entrenós curtos (Mok et al., 2000).

Plantas transgênicas com alterações no conteúdo de citocininas, e consequentemente no balanço AIA/Cks, apresentam duas características sempre presentes: pouca alteração na forma e no tamanho da parte reprodutiva (flores e sementes) e diminuição da dominância apical tanto em plantas transgênicas com excesso (Medford et al., 1989; Rupp et al., 1999) quanto com falta (Mok et al., 2000; Werner et al., 2001) de citocininas.

No processo de dominância apical, o ápice em crescimento de um caule inibe o crescimento de ápices laterais na mesma planta. A explicação mais difundida para a dominância apical é a hipótese da inibição da auxina, a qual diz que esse hormônio produzido no ápice move-se basipetamente para as gemas laterais e inibe seu crescimento. Uma das evidências para essa hipótese é a demonstração de que a perda da dominância apical promovida pela decapitação do ápice é recuperada pelo tratamento da planta decapitada com auxina. Contudo, essa explicação não contempla a constatação de que o efeito inibitório da auxina, vinda do ápice ou aplicada, pode ser revertido pela aplicação de citocininas nas gemas laterais (Peres & Kerbauy, 2004). Isso sugere que a dominância apical é uma típica resposta ao balanço AIA/Cks, assim como

outros processos do desenvolvimento vegetal. Desse modo, um melhor entendimento da dominância apical ocorreu quando se constatou que as citocininas vindas das raízes tendem a se acumular nos ápices produtores de auxina, promovendo um balanço AIA/Cks favorável ao seu desenvolvimento. Com a remoção da gema apical, as citocininas passam a se acumular nas gemas laterais promovendo seu desenvolvimento (Li et al., 1995).

A aplicação de auxina na ponta de plantas decapitadas mantém o dreno e a dominância. Dessa forma, a dominância apical depende da formação de gradientes de auxinas e citocininas para que drenos sejam estabelecidos. A ausência desses gradientes em plantas transgênicas, devido à fusão dos genes de biossíntese ou inativação de citocininas com promotores constitutivos, explicaria a reduzida dominância apical apresentada ao mesmo tempo por plantas com altos e baixos níveis desse hormônio (Peres & Kerbauy, 2004).

No entanto, nem todos os efeitos de citocininas e auxinas no desenvolvimento são dependentes de um balanço entre essas duas classes hormonais. A exemplo disso, plantas transgênicas de tabaco com superprodução de auxina (Sitbon et al., 1992) diferem em alguns aspectos daquelas que têm pouca produção de citocininas (Werner et al., 2001), apesar delas tenderem a ter balanços AIA/Cks semelhantes. Como características comuns, os dois tipos de transgênicos tendem a apresentar nanismo, epinastia e sistema radicular excessivamente desenvolvido.

Como já foi dito, o balanço AIA/Cks é essencial para o desenvolvimento vegetal. Esse balanço é controlado, em essência, pelos processos de biossíntese e inativação desses hormônios. Uma das maneiras de se estudar esses processos é através de mutantes. Nos próximos itens serão discutidos mutantes já descritos em *Arabidopsis thaliana* e *Lycopersicon esculentum*, para essas duas classes hormonais.

2.2 Auxinas

A principal auxina de ocorrência natural, denominada ácido indolil-3-acético (AIA), é a mais abundante e de maior relevância fisiológica (Taiz & Zeiger, 1998), e é uma molécula que controla a divisão e a expansão celular. O AIA regula vários eventos

do desenvolvimento vegetal, incluindo o estabelecimento da simetria bilateral no embrião (Liu et al., 1993), formação de raízes e dominância apical, bem como respostas ambientais como o gravitropismo e o fototropismo (Davies, 1995). A maior parte do AIA nas plantas é encontrado conjugado através de seus grupos carboxílicos a uma variedade de aminoácidos, peptídeos e carboidratos (Cohen & Bandurski, 1982).

As auxinas são sintetizadas em ápices caulinares, primórdios foliares e folhas jovens e também é encontrado em flores, frutos e sementes. As auxinas têm como precursor o triptofano, pelo menos na maioria das espécies vegetais. Entretanto, mutantes em milho e *Arabidopsis* que não sintetizam triptofano, ainda produzem AIA (Raven et al., 2001). Assim, os vegetais são aparentemente capazes de produzir esse hormônio essencial através de vias independentes do triptofano (Normanly et al., 1995; Bartel, 1997; Ljung et al., 2002). A figura 1 mostra as vias propostas para a biossíntese de AIA a partir do triptofano.

Figura 1 – Biossíntese de AIA a partir do triptofano (Adaptado de Normanly et al., 1995)

Uma das vias dependentes do triptofano, a que emprega indol-3-acetamida como intermediário, é usada por várias bactérias patogênicas, como *Agrobacterium tumefaciens*. A bactéria transfere o T-DNA para a planta, o qual contém os genes para as enzimas triptofano monooxigenase (*iaaM*) e indol-3-acetamida hidrolase (*iaaH*). Essas duas enzimas promovem a conversão do triptofano a indol-3-acetamida e a hidrólise da indol-3-acetamida a AIA (Davies, 1995; Bartel, 1997).

A inativação da auxina pode ocorrer por oxidação ou conjugação. Na oxidação, ocorre a quebra da cadeia lateral pela peroxidase. Porém, a peroxidase parece só promover essa quebra *in vitro*. Na planta (*in vivo*), é o anel indólico que costuma ser

quebrado por uma enzima ou sistema enzimático conhecido como “IAA-oxidase”, a qual ainda não foi purificada e isolada. Na conjugação, a auxina é ligada a um açúcar (e.g. glicose) ou a um aminoácido (e.g. aspartato). Tais conjugados são considerados inativos (Bandurski et al., 1995).

2.2.1 Mutantes em Auxinas

Mutantes com alterações nos genes que codificam as principais enzimas da biossíntese e inativação e as proteínas envolvidas na via de sinalização de auxinas e citocininas têm sido utilizados para se estudar tanto o metabolismo quanto a transdução de sinal dessas duas classes hormonais. Alguns desses mutantes já foram descritos principalmente para o modelo genético *Arabidopsis thaliana* (Quadro 1), embora uma pequena quantidade também seja disponível em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*).

Considerando-se o metabolismo de auxina em *Arabidopsis*, são conhecidos pelo menos dois mutantes que alteram seu nível endógeno: *superroot1* (Boerjam et al., 1995) e *IAA-leucine resistant* (Bartel & Fink, 1995). O mutante *superroot1* (*sur1*) é caracterizado por um maior acúmulo tanto de ácido indolil-3-acético (AIA) livre quanto de seus conjugados (AIA ligado a açúcares ou aminoácidos). Esses mutantes apresentam alterações fenotípicas tais como desenvolvimento restrito, cotilédones epinásticos e hipocótilos longos, além do desenvolvimento excessivo de raízes adventícias e laterais. De modo consistente, plantas transgênicas de *Arabidopsis* transformadas com genes de bactérias para biossíntese de auxina (genes *iaaH* e *iaaM*) possuem características morfológicas semelhantes ao mutante *sur1* (Boerjam et al., 1995; Seo et al., 1998). Como mencionado anteriormente, a maior parte do AIA em plantas é encontrado conjugado através do seu grupo carboxílico a uma variedade de aminoácidos e carboidratos. Esses conjugados são considerados formas de inativação de auxina (Normanly et al., 1995). O mutante recessivo *ilr1* não consegue promover a quebra do conjugado IAA-Leu e, portanto, não reativa o AIA à sua forma livre. Embora o mutante *ilr1* não consiga reativar conjugados inativos de AIA, o que deve levar a uma diminuição dos níveis endógenos de auxina ativa, ele não é verdadeiramente um

mutante auxotrófico. Mutantes auxotróficos para auxina estariam mais associados a lesões nos genes que codificam enzimas chaves da via biossintética dessa classe hormonal. Tais mutantes provavelmente são impossíveis de se conseguir, já que a biossíntese de auxina é múltipla (Figura 1), ocorrendo, por exemplo, vias dependentes e independentes do aminoácido triptofano como precursor (Normanly et al., 1995). Desse modo, uma mutação afetando uma dessas vias seria compensada pelo funcionamento da outra.

Apesar da via de transdução de sinal de auxina estar longe de ser elucidada, alguns mutantes afetando a sensibilidade a essa classe hormonal já foram isolados em *Arabidopsis*. Basicamente, somente mutantes pouco sensíveis à auxina são conhecidos (e.g. *aux1* e *axr1*), não existindo até o momento mutantes super sensíveis (Quadro 1). Contudo, é de amplo conhecimento que plantas transgênicas expressando os genes *rolABC* de *Agrobacterium rhizogenes* são hiper sensíveis à auxina (Delbarre et al., 1994). Tais plantas possuem um amplo sistema radicular e perda de dominância apical, entre outras características mais marcantes. Do lado oposto, os mutantes pouco sensíveis à auxina, *aux1* e *axr1*, possuem poucas raízes, as quais não apresentam gravitropismo. O mutante *aux1* foi caracterizado mais tarde como sendo um carreador de influxo de auxina (Bennett et al., 1996). Desse modo, a proteína AUX1 está presente na membrana e é similar às permeases de aminoácidos, tais como o triptofano, o qual é molecularmente relacionado ao AIA. O mutante *axr1* é defeitivo na regulação de várias famílias de genes de resposta à auxina, o que sugere que a proteína AXR1 é necessária para respostas imediatas à auxina (Timpote et al., 1995; Abel et al., 1995). A clonagem do gene *AXR1* revelou que ele codifica um componente do sistema ubiquitina para degradação de proteínas. Desse modo, provavelmente a sinalização de auxina envolve a degradação de proteínas repressoras de genes de resposta à auxina (Guilfoyle et al., 1998). Em adição à sinalização de auxina, a proteína AXR1 está envolvida na resposta ao metil jasmonato, sugerindo um mecanismo de ligação entre o jasmonato e a via de sinalização de auxina (Tiryaki & Staswick, 2002; Dharmasiri & Estelle, 2004).

Em tomateiro, encontramos o mutante *diageotropica* (*dgt*), que é caracterizado como uma planta anã, com crescimento diageotrópico dos caules e raízes, e raízes sem

ramificação. É defeitivo na via de transdução de sinal de auxina (Hicks et al., 1989; Christian et al., 2003). As plantas de tomateiro contendo essa mutação são praticamente insensíveis à auxina, afetando processos como crescimento (Kelly & Bradford, 1986; Muday et al., 1995; Christian & Lüthen, 2000; Rice & Lomax, 2000), extensibilidade da parede celular (Daniel et al., 1989), expressão de genes de resposta à auxina (Mito & Bennett 1995; Nebenführ et al., 2000) e produção de etileno (Zobel, 1973; Kelly & Bradford, 1986; Madlung et al., 1999). Esse mutante também apresenta uma resposta anormal ao gravitropismo (Rice & Lomax, 2000; Madlung et al., 1999). A concentração de AIA nas células do mutante *dgt* é a mesma do tipo selvagem (Fujino et al., 1988). O defeito do mutante *dgt* está associado com alguns eventos primários na ação da auxina (Kelly & Bradford, 1986) e a percepção ou resposta à auxina é mais alterada nesse mutante do que o transporte e/ou metabolismo (Christian et al., 2003).

Coenen et al. (2002) mostraram que raízes de plantas jovens do mutante *dgt* são sensíveis à auxina, mas perdem essa sensibilidade durante o desenvolvimento posterior. Isso sugere que existem várias vias de sinalização de auxina, não sendo todas dependentes da proteína DGT. A via dependente de DGT altera o funcionamento das bombas de H^+ e a extensibilidade da parede celular, os quais são parâmetros que controlam o chamado "crescimento ácido" em resposta à auxina (Christian et al., 2003).

Características como dominância apical reduzida, caules rígidos e ausência de ramificação lateral nas raízes primárias e adventícias estão presentes no mutante *dgt* (Zobel, 1972, 1973; Coenen & Lomax, 1998). Muito desse fenótipo complexo do mutante *dgt* pode ser explicado pela sensibilidade reduzida de tecidos mutantes à auxina, que tem sido demonstrado em segmentos de raiz e de hipocótilo (Kelly & Bradford, 1986; Muday et al., 1995). Coenen e Lomax (1998) verificaram que explantes de hipocótilo do mutante *dgt* cultivados *in vitro*, apresentaram reduzida sensibilidade à auxina, porém apresentaram sensibilidade normal à citocinina.

Tipo de mutante	Via afetada	Efeito	Exemplos	Ref/Obs
Cks (+) superprodutor	Metabolismo	Maior nível endógeno devido à maior biossíntese, menor inativação ou maior reativação	<i>amp1, hoc</i>	1, 2
Cks (-) auxotrófico	Metabolismo	Menor nível endógeno devido à menor biossíntese, maior inativação ou menor reativação		3
AIA (+) superprodutor	Metabolismo	Maior nível endógeno devido à maior biossíntese, menor inativação ou maior reativação	<i>sur1</i>	4
AIA (-) auxotrófico	Metabolismo	Menor nível endógeno devido à menor biossíntese, maior inativação ou menor reativação	<i>iir1</i>	5
Cks (+) supersensível	Sensibilidade	Maior expressão de um regulador positivo ou menor expressão de regulador negativo	<i>ire1</i>	6
Cks (-) insensível	Sensibilidade	Menor expressão de um regulador positivo ou maior expressão de um regulador negativo	<i>cre1, ckr1</i>	7, 8
AIA (+) supersensível	Sensibilidade	Maior expressão de um regulador positivo ou menor expressão de regulador negativo		9
AIA (-) insensível	Sensibilidade	Menor expressão de um regulador positivo ou maior expressão de um regulador negativo	<i>aux1, axr1</i>	10, 11

Quadro 1. Mutantes possíveis no metabolismo e na transdução de sinal de auxina e citocinina em *Arabidopsis*

Ref/Obs:

1- Chaudhury et al., 1993; Helliwell et al., 2001; 2- Catterou et al., 2002; 3- Não existem mutantes auxotróficos para citocininas; 4- Boerjam et al., 1995; Seo et al., 1998; 5- O mutante *iir1* (Bartel & Fink, 1995) não é verdadeiramente auxotrófico; 6- Cary et al., 2001; 7- Inoue et al., 2001; 8- O mutante *ckr1* (Su & Howell, 1992) é na verdade um mutante em etileno; 9- Até o presente, não se tem notícia de mutantes supersensíveis à auxina, embora isso possa ser conseguido através de plantas transgênicas; 10- Bennett et al., 1996; 11- Timpote et al., 1995;

2.3 Citocininas

As citocininas estão envolvidas em diferentes processos do desenvolvimento, como a divisão e diferenciação celular (Skoog & Miller, 1957; Mok, 1994), formação de gemas caulinares (Skoog & Miller, 1957), formação de cloroplastos (Mok & Mok, 2001) e senescência foliar (Mok, 1994; Haberer & Kieber, 2002; Mok & Mok, 2001). As citocininas promovem ainda o desestiolamento, a quebra da dominância apical e a interação planta-patógeno (Haberer & Kieber, 2002). As citocininas têm seus principais centros produtores nas raízes das plantas (Van Staden & Smith, 1978). Porém, outros tecidos meristemáticos, como ápices caulinares, também podem produzir citocininas, sendo isso evidenciado em vegetais que não possuem raízes (Chen & Petschow, 1978; Peres et al., 1997). Os precursores de citocininas são nucleotídeos e isopentenilpirofosfato.

Até 2001, o modelo corrente para a biossíntese de citocininas previa a adição de isopentenilpirofosfato (Δ^2 -iPP) à posição N⁶ de AMP pela enzima isopentenil transferase (IPT) produzindo a citocinina ribotídeo N⁶ Δ^2 -isopenteniladenosina monofosfato [9R-5'P]iP (Figura 2). Os primeiros genes codificando a enzima IPT foram isolados em bactéria e não em plantas. A enzima isopentenil transferase (IPT) também é codificada pelo gene *IPT* em *Arabidopsis thaliana*. O gene *IPT* ou *TMR* presente no T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* produz [9R-5'P]iP. Uma outra alternativa para biossíntese de citocininas em plantas seria o tRNA. A terminação 3' do anticódon do tRNA possui citocininas, o que leva, inclusive, à hipótese de que essas citocininas estão envolvidas no controle da biossíntese de proteínas. No entanto, a maior parte das citocininas biologicamente ativas não ocorrem no tRNA. No tRNA predomina cis-Z e não trans-Z. A liberação de cis-Z a partir de tRNA, e posterior conversão para trans-Z por uma cis-trans isomerase (Mok & Mok, 2001), pode ser uma via indireta de produção de citocininas, mas não a principal, pois tecidos auxotróficos para citocininas obviamente possuem tRNA (Letham & Palni, 1983).

Desde o isolamento e seqüenciamento do gene *IPT* de *Agrobacterium*, várias tentativas foram feitas no sentido de se encontrar seqüência de DNA de plantas possuindo homologia com *IPT* (Binns, 1994). Após a finalização do seqüenciamento do

genoma de *Arabidopsis*, a análise *in silico* possibilitou Takei et al. (2001) e Kakimoto (2001), em estudos independentes, a identificar um total de nove homólogos de *IPT*, designados *AtIPT1* a *AtIPT9*. Análises filogenéticas indicaram que *AtIPT2* e *AtIPT9* codificam possíveis tRNA-IPT enquanto os outros sete *AtIPTs* são mais homólogos ao gene bacteriano *IPT/TMR* (ao nível de aminoácidos, *AtIPT4* é 44,7% similar ao *IPT* de *Agrobacterium*). A expressão de sete desses genes em *Escherichia coli* resultou na secreção de iP e Z, confirmando que eles codificam genes de biossíntese de citocininas (Takei et al., 2001).

Figura 2 – Biossíntese de citocininas. A enzima isopentenil transferase (IPT) é codificada pelo gene *IPT* em *A. tumefaciens* e pelo gene *AtIPT4* em *A. thaliana*. Diferentemente de bactéria, a IPT de plantas utiliza preferencialmente ATP ou ADP ao invés de AMP. Fonte: Peres & Kerbauy, 2004

As plantas mantêm um controle estrito dos níveis endógenos de citocininas e um dos mecanismos para tal é através da conjugação. Existe uma série de posições onde as citocininas podem ser conjugadas com açúcares, tais como glicose e ribose. Em casos raros, as citocininas também podem se conjugar com aminoácidos. Um outro importante mecanismo de modulação do nível de citocininas ativas é a quebra da cadeia lateral, pela enzima citocinina oxidase (Hare & Van Staden, 1994; Werner et al., 2001).

2.3.1 Mutantes em Citocininas

De modo semelhante ao discutido para auxina, também não existem mutantes auxotróficos para citocininas (Quadro 1). Tais mutantes poderiam ser letais ou simplesmente, como se verá adiante, teriam seu fenótipo tamponado devido a redundâncias na via biossintética de citocininas. O gene *IPT* presente no T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* codifica a enzima isopentenil transferase (IPT), a qual produz citocinina a partir nucleotídeos (AMP) e moléculas de isopreno. Como mencionado anteriormente, Takei et al. (2001) e Kakimoto (2001), em estudos independentes, identificaram um total de nove homólogos de *IPT*, designados *AtIPT1* a *AtIPT9* no genoma de *Arabidopsis*. A descoberta de mais de um gene para a mesma reação de biossíntese de citocininas confirma a hipótese de que a redundância nessa via tamponaria o fenótipo de possíveis mutantes. Desse modo, a inativação de um dos genes *AtIPT* seria suprida pelo funcionamento de outros. Na impossibilidade de se obter mutantes auxotróficos para citocininas e assim observar o fenótipo de plantas Cks (-), Schmülling et al. obtiveram plantas transgênicas de *Arabidopsis* e tabaco superexpressando uma enzima de degradação dessa classe hormonal (Werner et al., 2001).

Embora não existam mutantes auxotróficos para citocininas, já foram isolados dois mutantes que super produzem essa classe hormonal: *altered meristem program 1* (Chaudhury et al., 1993) e *high organogenic competence* (Catterou et al., 2002). A super produção de citocininas no mutante *altered meristem program 1 (amp1)* lhe confere características como perda da dominância apical, senescência retardada,

inibição do estiolamento no escuro (desestiolamento) e aumento na regeneração em cultura de tecidos (Chaudhury et al., 1993). De modo semelhante, o mutante *high organogenic competence*, (*hoc*) apresenta alta capacidade organogênica para formação de gemas caulinares *in vitro*, mesmo na ausência de reguladores de crescimento. Além disso, o mutante *hoc* apresenta um fenótipo adensado com rosetas supernumeradas, embora a filotaxia seja normal. No escuro, o mutante *hoc* também é desestiado, com hipocótilo curto e cotilédones expandidos (Catterou et al., 2002). Embora não se saiba a função do gene *HOC* funcional, especula-se que ele pode estar envolvido no metabolismo de citocinina, induzindo uma superprodução desse hormônio. Quanto ao gene *AMP1*, hoje sabe-se que ele codifica um peptídeo altamente similar à carboxipeptidase do glutamato. Tal enzima pode estar envolvida na clivagem e ativação de peptídeos sinalizadores, os quais atuam na regulação de alguns aspectos do desenvolvimento, em particular no tamanho do meristema apical e na biossíntese de citocinina (Helliwell et al., 2001).

De modo contrário às auxinas, muitos componentes da via de transdução de sinal de citocininas foram recentemente descobertos. Postula-se atualmente, que a sinalização de citocininas envolveria o chamado sistema regulatório de dois componentes ("two-component regulatory system"), inicialmente descrito em bactérias. Esse sistema, comum em procariotos, eucariotos simples e plantas, consiste de uma enzima quinase do tipo histidina (componente 1), que percebe a entrada do sinal, e de um regulador de resposta (componente 2) que medeia a saída do sinal. O componente 1 é portanto o receptor de citocininas, o qual foi identificado por Inoue et al. (2001) através do mutante *cre1* (*cytokinin response 1*). Embora o mutante *cre1*, insensível à citocinina, tenha um desenvolvimento normal dos caules surgidos na germinação de sementes, ele apresenta falha na formação de gemas em cultura de tecidos. Isso sugere que a proteína CRE1 funcional é um receptor presente em calos e que outros receptores que agem na planta como um todo, não agem em calos. Além de se expressar em calos, a análise de expressão do gene *CRE1* indica que ele é predominantemente expresso nas raízes. De modo oposto a *cre1*, o mutante *ire1* (*increased organ regeneration 1*) é supersensível à citocinina (Cary et al., 2001). Tal mutante apresenta precocidade no desenvolvimento do hipocótilo e na expansão dos

cotilédones, além de possuir alta capacidade de regeneração *in vitro*, mesmo em concentrações muito pequenas de citocininas. Desse modo, conclui-se que o gene *IRE* é um regulador negativo da aquisição de competência, que reprime o programa de regeneração de gemas caulinares e raízes. Como a mutação desse gene implica na perda de função, não há mais a regulação negativa da aquisição de competência, fazendo com que o mutante tenha maior capacidade de regeneração em comparação com o tipo selvagem.

Embora haja disponibilidade de vários mutantes em citocinina para *Arabidopsis*, ainda não se conhece nenhum mutante de tomateiro nessa classe hormonal.

2.4 Competência para regeneração *in vitro*

A competência para regeneração pode ser definida como a capacidade das células em responder a um estímulo (Meins & Binns, 1979). Os fatores que determinam a competência para a regeneração incluem gradientes bioquímicos e fatores de controle posicional a nível celular, como o tipo e o tamanho da célula, e seu estado de diferenciação (Gilissen et al., 1996). O processo de organogênese é dividido em diferentes fases: dediferenciação, aquisição de competência, indução, determinação e diferenciação. A não obtenção da regeneração de plantas *in vitro* seria atribuída à falha do explante em adquirir a necessária competência para indução do processo (Christianson & Warnick, 1988).

Os hormônios estão incluídos entre os fatores bioquímicos e são determinantes na aquisição de competência do explante, especialmente auxinas e citocininas, que controlam os principais eventos celulares: expansão, divisão e diferenciação. Esses hormônios são essenciais para a regeneração de plantas *in vitro* (Skoog & Miller, 1957).

Além dos fatores bioquímicos e de nível celular, fatores ambientais como a luz, podem interferir na capacidade de regeneração. As plantas percebem e respondem a sinais ambientais que controlam seu desenvolvimento. A luz é um dos mais importantes sinais ambientais, e os numerosos efeitos da luz no desenvolvimento das plantas são mediados por diferentes famílias de fotorreceptores, como os fitocromos. A aquisição de competência para regeneração *in vitro* em hipocótilos de tomateiro é dependente da

luz e é mediada pelos fitocromos PhyA e PhyB (Bertram & Lercari, 2000). A superexpressão de fitocromos pode resultar no aumento da competência para regeneração em explantes de raiz, caule e folha (Carvalho, 2004).

As diferentes fases da organogênese e os diferentes processos que ocorrem a nível celular durante o processo de regeneração *in vitro*, além dos diferentes estímulos aos quais os explantes são submetidos como quantidade e qualidade da luz, temperatura, umidade, nutrientes minerais, vitaminas, hormônios, entre outros, são na verdade, a reprodução do desenvolvimento em condições artificiais (Peres, 2002). O controle adequado dessas condições é determinante no sucesso da regeneração *in vitro*.

2.5 Micro-Tom como modelo fisiológico

O tomateiro é um excelente modelo para estudar processos biológicos. A diversidade de metabólitos secundários (Tanksley, 1993) e tecidos que facilitam análises bioquímicas, além do próprio padrão morfogenético diferente de *Arabidopsis*, coloca o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (Pratt et al., 1997). O tomateiro possui um genoma relativamente pequeno ($7,1 \times 10^8$ pb), mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (Rick & Yoder, 1988; Tanksley et al., 1992) e uma ampla riqueza de germoplasma constituída por nove espécies selvagens de *Lycopersicon* que podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (Stevens & Rick, 1986). A alta capacidade de regeneração por hipocótilo e cotilédones levou Lipucci di Paola et al. (1983) a destacarem o tomateiro como um excelente modelo para estudos de cultura de tecidos *in vitro*. Além disso, o tomateiro é uma espécie cultivada e de grande importância econômica, e apresenta frutos carnosos, o que possibilita estudos sobre o desenvolvimento desse tipo de órgão (Hong & Lee, 1993). Uma outra vantagem ainda do tomateiro em relação à *Arabidopsis*, é a possibilidade de se fazer enxertias, que possibilita estudos entre a interação do sistema radicular com a parte aérea da planta (Jackson, 2001; Ling et al., 2002).

As principais limitações para a utilização intensiva de tomateiro como modelo em abordagens genéticas de diversas questões fisiológicas, são seu tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em franca desvantagem quando comparados aos de *Arabidopsis*, a qual é o modelo genético mais utilizado em pesquisas com plantas. Tomando-se vantagem da própria riqueza de germoplasma do tomateiro, há possibilidade de se criar um sistema de estudos nessa espécie nos moldes que se tem hoje em *Arabidopsis*. Desse modo, a cultivar miniatura de tomateiro, recentemente proposta 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 de vida em 70-90 dias. Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis*.

Mutantes de tomateiro podem ser usados como uma eficiente ferramenta em estudos genéticos para compreender os genes e suas funções. Poucas mutações foram bem caracterizadas a nível molecular nesta espécie, apesar de terem sido coletadas durante muitas décadas. A exemplo disso podemos citar mutações espontâneas e induzidas (Emmanuel & Levy, 2002). Entre as várias mutações já descritas em tomateiro, contam-se mutantes que apresentam alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios do tipo auxina (Kelly & Bradford, 1986; Hicks et al., 1989), ácido abscísico (Taylor et al., 2000; Burbidge et al., 1999), giberelinas (Koornneef et al., 1990; Bensen & Zeevaart, 1990), etileno (Fujino et al., 1988; Wikinson et al., 1995) e brassinoesteróides (Bishop et al., 1999; Koka et al., 2000).

A competência para regeneração *in vitro* pode ser transferida de espécies selvagens de *Lycopersicon* para espécies cultivadas, como o *Lycopersicon esculentum* (Koornneef et al., 1986). A regeneração de brotos caulinares a partir de segmentos de raiz é controlada por um gene dominante, o *Rg-1*, mapeado no cromossomo 3 de *L. peruvianum* e introgridido na cultivar Msk (*L. esculentum*). Os frutos das plantas que contêm o gene *Rg-1* são amarelos. Esse efeito é promovido por uma mutação recessiva *r* (yellow flesh), a qual cossegrega com o locus *Rg-1*, devido à mesma localização no cromossomo 3 (Koornneef et al., 1993). Esta característica do fruto pode ser usada como marcador morfológico para o locus da alta capacidade de regeneração. Plantas

de *L. esculentum* cv. Micro-Tom não regeneram a partir de raiz. A introgressão da cultivar Msk na cultivar Micro-tom, possibilita a obtenção de uma planta modelo para estudos genéticos e fisiológicos. Plantas Micro-Msk apresentam formação de calos verdes *in vitro* a partir de explantes radiculares. Essas plantas apresentam ainda reduzida dominância apical, o que resulta em maior ramificação do caule (Carvalho, 2004; Lima et al., 2004) e senescência foliar atrasada (Lima et al., 2004). Essa intensa ramificação do caule sugere que essa resposta é mediada também pelo locus Rg-1, possibilitando mais uma ferramenta para triagem desse genótipo.

O objetivo do presente trabalho foi criar um modelo para se estudar o papel da resposta ao balanço auxina/citocinina endógeno na competência para regeneração *in vitro*. Para tanto, as seguintes metas foram propostas:

- I) Incorporar na cv Micro-Tom as mutações *dgt*, *brt*, *gf*, *lutescent*, *ls* e *bu*, as quais sugerem alterações no metabolismo e/ou sensibilidade hormonal.
- II) Caracterizar as referidas mutações quanto à sua sensibilidade aos hormônios auxina e citocinina através da obtenção de curvas de dose-resposta.
- III) Testar a capacidade de regeneração *in vitro* das mutações caracterizadas para auxina e citocinina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) contendo as mutações *dgt*, *brt*, *gf*, *lutescent*, *ls* e *bu* (Tabela 1) e a cultivar Micro-Tom. Os parentais dos mutantes foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Chetelat (Tomato Genetics Research Center - TGRC - University of California, Davis, USA) e o parental Micro-Tom foi fornecido pelo Dr. A. Levy (Weizmann Institute of Science - Israel). As mutações utilizadas no presente trabalho como sendo possíveis mutantes com alterações na sensibilidade ou metabolismo de auxinas e citocininas foram escolhidas em um banco de germoplasma (<http://tgrc.ucdavis.edu>) contendo 994 mutantes monogênicos distribuídos em 614 *loci*. O critério para escolha foi baseado da descrição de suas características fenotípicas (Tabela 1), as quais foram confrontadas com conhecimentos clássicos sobre o efeito dessas duas classes hormonais no desenvolvimento vegetal.

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 diageotrópico dos caules e raízes; raízes sem ramificação. Defectivo na via de transdução de sinal de auxina.	Kelly & Bradford, 1986
<i>bushy root (brt)</i>	Raízes excessivamente ramificadas, planta anã	Zobel, 1991
<i>green flesh (gf)</i>	Retenção da clorofila durante a maturação, retardando a senescência foliar	Akhtar, 1999
<i>lutescent (l)</i>	Senescência acelerada, ovário branco	*
<i>lateral suppressed (ls)</i>	Pouca ou nenhuma ramificação lateral, flores sem corola e parcialmente macho-estéreis.	Tucker, 1979
<i>bushy (bu)</i>	Entrenós e inflorescências curtas, pecíolos longos	*

* <http://tgrc.ucdavis.edu>

3.2 Cultivo em casa de vegetação

As plantas foram cultivadas inicialmente na casa de vegetação do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) e posteriormente na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal.

Para germinação das sementes e cultivo das plantas, foi utilizado um substrato contendo Plantmax HT e vermiculita, na proporção 1:1, e 4 g por litro de substrato de calcário dolomítico (Ca+Mg). Os nutrientes minerais (NPK) foram adicionados periodicamente às plantas.

A semeadura foi feita em vasos e bandejas. Para a semeadura em vasos de 250 mL, cerca de 10 a 15 sementes foram enterradas no substrato previamente umedecido. Para o cultivo em vasos de 20 L, as sementes foram germinadas inicialmente em vasos de 250 mL e posteriormente foram transplantadas para esses vasos. Para a semeadura em bandejas, as sementes foram espalhadas aleatoriamente e em alta densidade sobre

o substrato também previamente umedecido, e em seguida elas foram cobertas com uma fina camada de substrato (cerca de 5 mm).

As plantas cujas sementes foram germinadas em vasos de 250 mL e bandejas, foram, em seguida, transplantadas para vasos de 150 mL e colocadas em canaletas. A irrigação foi feita de maneira automatizada para todas as plantas, 4 vezes ao dia em intervalos de 3h.

Mais detalhes sobre o cultivo em casa de vegetação podem ser obtidos na página: <http://www.ciagri.usp.br/%7Elazaropp/protocol/ManualCultivo.PDF>

3.3 Cruzamentos

Anteras foram retiradas de flores recém abertas dos mutantes, para obtenção de pólen. Para isso, utilizou-se uma pinça nº 02. A ponta da pinça foi passada no interior das anteras e assim, o pólen que ficou aderido a ela foi aplicado diretamente sobre o estilete de plantas Micro-Tom, previamente emasculadas (retirada das anteras das flores). As flores de Micro-Tom foram emasculadas quando as sépalas já estavam abertas e as pétalas ainda estavam fechadas, garantindo que o óvulo dessa flor ainda não havia sido autofecundado, mas já estava apto para receber o pólen.

Mais detalhes sobre os cruzamentos e o processo de obtenção de linhagens quase isogênicas podem ser obtidos na página:

<http://www.ciagri.usp.br/%7Elazaropp/protocol/ManualCruzamento.PDF>

3.4 Coleta e processamento das sementes

As sementes foram coletadas de frutos maduros, juntamente com a polpa e foram mantidas durante dois dias sob fermentação, num copo plástico contendo água e fermento biológico liofilizado, para facilitar a retirada da mucilagem que fica ao redor da semente. Em seguida, o fermentado foi despejado em uma peneira, na qual ficaram retidas apenas as sementes. Estas foram lavadas em água corrente, despejadas e espalhadas sobre papel, no qual foram deixadas secar ao ar livre, durante 2 dias. As sementes foram retiradas do papel com auxílio de uma régua, e colocadas em

envelopes de papel alumínio e armazenadas em caixas plásticas contendo dessecante (sílica ou sulfato de cálcio) sob refrigeração (7 a 14 °C).

3.5 Seleção dos mutantes

A seleção dos mutantes foi feita utilizando-se marcadores morfológicos, baseados no fenótipo da planta (Tabela 1). Para alguns mutantes, foi possível fazer a triagem ainda no estágio inicial de desenvolvimento. Para outros, essa triagem foi possível apenas após a formação dos frutos.

A geração F1 obtida a partir do cruzamento entre os mutantes e a cultivar Micro-Tom foi cultivada em vasos de 20 L, devido ao grande porte promovido pela heterozigose dos alelos. Plantas F1 foram autofecundadas produzindo F2. As sementes F2 foram germinadas em bandejas, com semeadura em alta densidade, a fim de se obter plantas segregantes homozigotas apresentando porte pequeno e ao mesmo tempo as mutações. Pólenes de plantas F2 foram coletados para a realização de retrocruzamento com Micro-Tom, originando BC1. A partir daí, as plantas foram cultivadas em vasos menores (150 mL).

Todas as mutações descritas neste trabalho são recessivas, e portanto, foram realizadas autofecundações a cada dois "backcross" (BCs) para que o fenótipo recessivo fosse visualizado em homozigose e selecionado. Após a sexta geração de retrocruzamentos (BC6) com o parental recorrente MT, as mutações podem ser consideradas quase isogênicas a esse parental. Contudo, para muitos experimentos fisiológicos, é aceitável o uso de gerações a partir de BC2.

3.5.1 Mutantes *dgt*

Plantas contendo a mutação *dgt* foram triadas a partir da visualização do fenótipo descrito para essa mutação, como crescimento diageotrópico dos caules e raízes, folhas hiponásticas e coloração verde-escura das folhas. O fenótipo do mutante *dgt* pode ser observado em plântulas com idade a partir de 2 semanas, podendo então

ser selecionadas e transplantadas para vasos individuais de 150 mL. Em plântulas com 30 dias, esse fenótipo é mais evidente (Figura 1A e 1B).

3.5.2 Mutantes *brt*

Mutantes *brt* apresentam raízes excessivamente ramificadas, são plantas anãs, e apresentam folhas verde-claras (Figura 1C e 1D). Esse mutante foi triado a partir da observação da ramificação da raiz principal de plântulas com 30 dias de idade, cujas sementes foram germinadas em rhizotrons (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Paulo Roberto de Camargo e Castro – LCB/ESALQ). Nesse sistema, foi possível distinguir o desenvolvimento radicular e fazer a comparação entre a ramificação das raízes do mutante *brt* e do Micro-Tom, em plântulas com 20 dias (Figura 7B). Além disso, essas plantas crescem mais lentamente que o Micro-Tom. Isso foi observado comparando-se plântulas com 30 dias, dos dois genótipos (Figura 1C e 1D). Foram feitas medidas de área foliar, utilizando-se plantas da mesma idade (85 dias) e com o mesmo tamanho. Foram realizadas medições de 4 plantas de cada fenótipo (*brt* e MT), utilizando-se sempre a 2ª e a 4ª folha de cada planta, depois dos cotilédones. A área foliar foi medida utilizando-se um planímetro eletrônico, modelo Li-3000A (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira – LCB/ESALQ). Para garantir uma boa leitura, e que não haveria sobreposição de um folíolo sobre o outro, foi feita a leitura de cada folíolo e do pecíolo separadamente, e depois esses valores foram somados, obtendo-se a área da folha toda. Foram realizadas 3 medições de cada folha, e depois obteve-se a média, em cm².

3.5.3 Mutantes *lutescent*

A mutação *lutescent* confere à planta um aspecto clorótico, pois apresenta senescência acelerada. Durante o processo de emasculação para realização dos cruzamentos, constatou-se que seu pistilo é branco, ao invés de verde, como acontece com o MT. Utilizando-se dessas características fenotípicas, a triagem desse mutante foi feita apenas após o florescimento, para que a coloração dos ovários fosse observada, já

que a senescência precoce das folhas costuma ficar bem evidente somente após o florescimento.

3.5.4 Mutantes *gf*

Ao contrário do mutante *lutescent*, o mutante *gf* apresenta senescência retardada de folhas e frutos. A clorofila é mantida ainda nos frutos maduros, sendo essa característica utilizada na triagem desse mutante. Além da polpa esverdeada, a mucilagem que envolve as sementes dos mutantes *gf* apresenta coloração verde (Figura 7C e 7D). Essas características foram utilizadas para a triagem desse mutante.

3.5.5 Mutantes *ls*

Plantas contendo a mutação *ls* apresentam pouca ou nenhuma ramificação lateral, flores sem corola e parcialmente macho-estéreis. A triagem dessas plantas foi feita com base na ausência da corola nas folhas (Figura 7F). Dessa forma, somente após o florescimento é que foi possível fazer a seleção das plantas mutantes.

3.5.6 Mutantes *bu*

Mutantes *bu* apresentam entrenós e inflorescências curtas e pecíolos longos. A triagem foi feita no início do desenvolvimento. Plantas com 3 semanas já apresentam entrenós curtos e pecíolos longos, podendo então serem selecionadas. Posteriormente, quando as flores e frutos são formados, o fenótipo é confirmado pelas inflorescências curtas. Os frutos formam-se bem próximos uns dos outros (Figura 7E), lembrando os frutos sésseis do mamoeiro.

Figura 1 – Fenótipo de *micro-dgt* e *micro-brt* na fase de plântula (30 dias), comparado com o Micro-Tom. Folhas hiponásticas e de coloração verde-escura no *micro-dgt* (A e B) e folhas de coloração verde-clara e de tamanho reduzido no *micro-brt*. Vista frontal (A e C) e superior (B e D)

3.6 Caracterização dos mutantes

Para caracterizar os mutantes quanto à classe hormonal, foram realizados testes de sensibilidade aos hormônios auxina, citocinina e etileno.

O teste de sensibilidade à auxina é tradicionalmente realizado com segmentos de hipocótilo (Kelly & Bradford, 1986). Durante a realização deste trabalho, foi desenvolvido e otimizado um protocolo para testar a sensibilidade à auxina, no qual utiliza-se segmentos de pecíolo. Esse método é vantajoso em relação aos segmentos de hipocótilo pois não é destrutivo à planta.

Para o teste de sensibilidade à auxina, foram retirados pecíolos de plantas com 40 dias, crescidas em casa de vegetação. Utilizou-se a terceira ou quarta folha de cada planta, as quais foram lavadas em água corrente. Foram seccionados segmentos de pecíolos com 12 mm de comprimento, os quais foram colocados numa solução contendo diferentes concentrações de AIA (0; 0.1; 1; 10 e 100 μM) e tampão de Kelly & Bradford (1986) (2.5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM KCl, 1.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e pH=5,2). Os pecíolos foram mantidos nessa solução durante 24 horas, em temperatura ambiente ($\approx 27^\circ\text{C}$), no laboratório. Após esse período, os pecíolos foram scaneados com resolução de 300 dpi, e as figuras foram impressas com aumento de 2 vezes. As medidas de comprimento do pecíolo foram transformadas em porcentagem do controle (ausência de AIA).

Para os testes de sensibilidade à citocinina e etileno, as sementes foram germinadas em gerbox escuro, sobre um papel de filtro umedecido com uma solução contendo diferentes concentrações de TDZ (0; 0.01; 0.1; 1; 10 e 100 μM) ou CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico) (0; 1; 10; 100 e 1000), respectivamente, e 0,5 g/L de Benlat, para impedir a proliferação de fungos. A cada 2 dias, o papel de filtro foi umedecido novamente. Após 10 dias, foram medidos o comprimento do hipocótilo e da raiz principal, com o auxílio de um paquímetro.

3.7 Teste da capacidade de regeneração *in vitro*

É de amplo conhecimento que o balanço AIA/Cks é determinante na formação de órgãos *in vitro* (Skoog & Miller, 1957). Dessa forma, os mutantes que apresentam alterações no metabolismo e/ou sensibilidade à auxina e/ou citocinina foram testados com relação à sua capacidade de regeneração *in vitro*.

3.7.1 Cultivo *in vitro*

Sementes dos micro-mutantes e Micro-Tom foram desinfestadas com álcool 95% durante 30 segundos, sendo em seguida transferidas para uma solução comercial de kiboá 50%, na qual permaneceram sob agitação durante 15 minutos. Essas sementes foram lavadas com água destilada e estéril em capela de fluxo laminar e inoculadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com metade da concentração dos macronutrientes, 3% de sacarose e 0.7% de ágar. O material foi incubado em BOD, no escuro, com temperatura de 25°C, durante 4 dias, para a germinação das sementes. Em seguida, foi transferido para BOD com fotoperíodo de 16 horas, na qual permaneceu por mais 4 dias. Após esse período, as plântulas estavam com aproximadamente 5 cm de altura e raízes bem desenvolvidas, o que possibilitou a retirada dos explantes.

3.7.2 Teste de regeneração

Para o teste de regeneração *in vitro*, foram utilizados 3 tipos de explantes: segmentos de hipocótilo, segmentos de raiz e pedaços de cotilédones. Os explantes foram inoculados em placas de Petri, contendo meio MS com 3% de sacarose, 0.7% de ágar e 5 µM de BA (segmentos de hipocótilo e pedaços de cotilédones) ou 4.5 µM de Zeatina (segmentos de raiz). O material foi incubado em sala de luz com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25°C, por 30 dias. Seguindo esse período, foi feita a avaliação do material baseando-se na porcentagem de explantes com gemas adventícias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do processo de seleção dos mutantes

Como dito anteriormente, os mutantes *brt*, *gf* e *lutescent* estavam sendo triados a partir da observação do sistema radicular, retenção da clorofila nos frutos e senescência acelerada (folhas com aspecto clorótico, amareladas) respectivamente. Esses parâmetros para seleção dos mutantes permitiam que eles fossem selecionados somente num estágio mais avançado do desenvolvimento. No caso do mutante *brt*, era necessário que as sementes fossem germinadas em rhizotron, e após 20 a 30 dias era possível selecionar os mutantes e transplantá-los para vasos de 150 mL. Para os mutantes *gf* e *lutescent*, a seleção era feita apenas após o amadurecimento dos frutos. Nesse estágio, as plantas já não apresentavam mais flores. Dessa forma, não era possível fazer a retirada das anteras para polinizar o parental recorrente Micro-Tom. Era necessário então que essas plantas fossem transplantadas para vasos de 2 L para que produzissem mais flores.

Desse modo, no decorrer deste trabalho foram desenvolvidos métodos que permitiram que o mutante *brt* passasse a ser triado em gerbox. Foi possível observar a ramificação das raízes em plântulas com 10 dias (Figura 3). As plântulas selecionadas foram então transplantadas para vasos de 150 mL e mantidas em casa de vegetação.

Os mutantes *gf* e *lutescent* passaram a ser triados com 30 dias, utilizando-se folhas totalmente expandidas (geralmente a segunda folha), as quais foram lavadas com água corrente e colocadas em gerbox (escuro) contendo uma folha de papel de filtro umedecido com água destilada. As folhas de *lutescent* e *gf* foram mantidas no gerbox durante 8 e 14 dias respectivamente, e em seguida, comparadas com o Micro-Tom. Folhas do mutante *gf* mantiveram-se verdes, como se tivessem sido retiradas da

planta naquele momento (Figura 4A). Já as folhas do mutante *lutescent* apresentaram maior degradação da clorofila (senescência acelerada) em comparação com as folhas do Micro-tom (Figura 4B).

4.2 Obtenção e caracterização dos micro-mutantes

Os cruzamentos realizados entre os mutantes e o MT, juntamente com a triagem das plantas que apresentavam porte pequeno e ao mesmo tempo carregando a mutação, resultaram na obtenção de micro-mutantes, em diferentes “backgrounds” (Figura 5). Essas diferenças devem-se ao fato de alguns mutantes apresentarem baixa fertilidade, como *bu* e *ls*.

O mutante *dgt* apresenta crescimento diageotrópico dos caules e raízes, e raízes sem ramificação (Figura 7A). É defeitivo na via de transdução de sinal de auxina (Hicks et al., 1989; Christian & Steffens, 2003). Além disso, apresenta dominância apical reduzida e caules rígidos (Zobel, 1972, 1973; Coenen & Lomax, 1998). As plântulas micro-*dgt* apresentam crescimento diageotrópico e folhas verde-escuras e hiponásticas (Figura 6A).

O mutante *brt* é caracterizado por apresentar raízes mais curtas e com grande número de ramificações laterais (Zobel, 1991). Seu fenótipo assemelha-se muito com o fenótipo de plantas transgênicas de outras espécies com baixos níveis de citocininas endógenas devido à superexpressão do gene para citocinina oxidase (Werner et al., 2001). Além disso, as plantas micro-*brt* possuem folhas menores e coloração verde mais clara em relação ao MT (Figura 6B). É possível observar também que as folhas das plantas micro-*brt* possuem as bordas mais recortadas (Figura 7B). Essa mutação pode estar associada à baixa sensibilidade à citocinina.

O mutante *gf* é deficiente no processo de degradação da clorofila, alterando tanto a senescência da folha quanto o amadurecimento do fruto (Bortolotti et al., 2003). Dessa forma, a clorofila é retida durante a maturação (Akhtar et al., 1999), e o mutante mantém-se verde por mais tempo. Plantas micro-*gf* apresentam estas mesmas características (Figura 6D). O atraso na senescência do mutante *gf* pode estar relacionada com uma maior sensibilidade à citocinina, já que esse hormônio inibe o

processo de senescência. A coloração verde-escura das folhas pode ser resultante de um maior número de cloroplastos, pois a citocinina está envolvida no processo de diferenciação dos cloroplastos (Davies, 1995). Uma outra possibilidade seria uma menor sensibilidade desse mutante ao etileno, o qual é responsável por desencadear o processo da senescência (Taiz & Zeiger, 1998).

O mutante *lutescent*, ao contrário do mutante *gf*, apresenta senescência acelerada. A planta fica com um aspecto clorótico, começando pelas bordas das folhas, até que toda a folha fica com esse aspecto. Os frutos do parental e de plantas BC1 permanecem amarelo-esbranquiçados e não adquirem a coloração vermelha, porém, à medida que essa mutação foi introgridida no Micro-Tom, os frutos passaram a amadurecer normalmente e, portanto, nas plantas micro-*lutescent* os frutos apresentam a coloração vermelha, além das demais características já citadas para esse mutante (Figura 6C). Essas características podem estar relacionada com menor sensibilidade à citocinina ou maior sensibilidade ao etileno. No entanto, se essa mutação estivesse relacionada com maior sensibilidade ao etileno, os frutos deveriam amadurecer mais rápido do que os frutos do MT e, no entanto, a maturação dos frutos é mais lenta nesse mutante.

O mutante *ls* é caracterizado por apresentar anormalidades no fenótipo nos diferentes estágios de desenvolvimento. Durante o desenvolvimento vegetativo, as células da axila do primórdio foliar perdem a característica de meristema, produzindo pouca ou nenhuma ramificação lateral (Malayer & Guard, 1964). O desenvolvimento da inflorescência de plantas *ls* homozigotas é caracterizado por um baixo número de flores por inflorescência, ausência de pétalas (Williams, 1960) e redução na fertilidade (Groot et al., 1994). Os defeitos morfológicos do mutante *ls* são acompanhados por drásticas mudanças nas concentrações de vários hormônios vegetais. Em comparação com o tipo selvagem, ápices de plantas *ls* homozigotas contêm concentrações muito maiores de auxinas e ácido giberélico, entretanto as concentrações de citocininas são reduzidas (Tucker, 1976). Schumacher et al. (1999) isolaram o locus *Ls* através de clonagem posicional e demonstraram a identidade do gene pela análise da sequência de dois alelos a esse mutante, *ls*¹ e *ls*². A proteína codificada pelo gene *LS* possui uma parte significativa de seqüências similares às seqüências dos membros da família de proteínas

VHIID, e está relacionada a duas proteínas envolvidas na regulação negativa da transdução de sinal de giberelinas.

O *micro-*ls** apresenta flores sem corola e praticamente nenhuma ramificação lateral (Figura 6F). Apresenta ainda fertilidade reduzida, sendo necessária a polinização manual de seus estigmas com seu próprio pólen. Por se tratar de um mutante com maior sensibilidade à giberelina, é esperado que plantas contendo essa mutação apresentem entrenós maiores (Silverstone & Sun, 2000). Isso foi comprovado medindo-se o tamanho de plantas *micro-*ls** e plantas MT (Figura 2).

Figura 2 – Altura do caule (cm) de plantas MT e *ls*

O mutante *bu* apresenta o fenótipo de entrenós e inflorescência muito curtos, além de pecíolos longos, promovendo alterações na forma e tamanho das folhas. Esse fenótipo sugere que essa mutação pode estar relacionada com um balanço AIA/Cks favorável à citocinina, já que o parental apresenta ramificação lateral do caule. Outra possibilidade seria baixa sensibilidade ou deficiência na biossíntese de giberelina (Silverstone & Sun, 2000). Sementes de tomateiros mutantes defectivos na via biossintética de giberelina têm dificuldade de germinar, sendo necessário tratá-las com esse hormônio para que germinem (Koornneef et al., 1990). No entanto, as sementes do mutante *bu* germinam normalmente, o que sugere que esse mutante não está relacionado com biossíntese ou sensibilidade à giberelinas. Além disso, foi observado que as plantas contendo essa mutação apresentam dificuldade para se

autofecundarem. Dessa forma, os frutos não possuíam sementes, o que dificultou a obtenção de gerações BCnF3, e conseqüentemente a introgressão dessa mutação na cultivar Micro-Tom. Foi necessário que o pólen fosse retirado com a pinça, e posteriormente colocado sobre o estigma das suas próprias flores, para que fossem produzidos frutos com sementes. No porte micro, essas plantas não apresentam mais a ramificação do caule (Figura 6E), o que de certa forma, sugere que esse não seja um mutante com alterações em auxina e/ou citocininas.

Como descrito ao longo deste item, com exceção do mutante *dgt*, os demais mutantes ainda não foram caracterizados, embora possuam fenótipos que sugerem alterações no metabolismo ou sensibilidade à auxina e citocinina. Nos itens a seguir serão descritos os testes feitos para se verificar a sensibilidade à auxina e citocinina, bem como a sensibilidade ao etileno, nos mutantes descritos.

Figura 3 – Triagem do mutante *brrt* em gerbox. Notar as raízes mais curtas e ramificadas do mutante *brrt*. Plântulas com 10 dias cultivadas em gerbox sob luz branca

Figura 4 – Senescência foliar dos mutantes *gf* (A) e *lutescent* (B) comparadas com o Micro-Tom, após 14 e 8 dias, respectivamente. Notar a senescência retardada em *gf* e acelerada no mutante *lutescent*

Figura 6 – Fenótipo dos micro-mutantes: *micro-dgt* (A), *micro-brt* (B), *micro-lutescent* (C), *micro-gf* (D), *micro-bu* (E) e *micro-ls* (F). À esquerda de cada figura está o parental MT

Figura 7 – Características específicas de cada mutante: raízes sem ramificação no micro-*dgt* (A); raízes mais ramificadas em plântulas micro-*brt* com 21 dias (B); retenção da clorofila na polpa dos frutos (C) e na mucilagem que envolve a semente (D) do micro-*gf*; entrenós e inflorescências curtas e pecíolos longos no micro-*bu* (E); ausência de pétalas no micro-*ls* (F)

4.2.1 Teste de sensibilidade à auxina

A sensibilidade das plantas à auxina tem sido testada utilizando-se segmentos de hipocótilo como material vegetal, de acordo com o protocolo descrito por Kelly & Bradford (1986). Entretanto, para facilitar a análise dos resultados (expansão do material nas diferentes concentrações de AIA) e para não “destruir” a planta, adaptamos esse protocolo para o modelo Micro-Tom, utilizando pecíolos ao invés de segmentos de hipocótilo. Já que plantas micro apresentam crescimento rápido, o teste foi realizado em plantas homozigotas com 40 dias. A retirada dos pecíolos não comprometeu a formação de frutos nas plantas, caracterizando esse modelo para testar a sensibilidade como não destrutivo. O pecíolo é um tecido menos tenro do que o hipocótilo utilizado por Kelly e Bradford, e possui coloração verde, o que facilita sua visualização e análise da sua expansão.

Para ajustar a metodologia utilizada por esses autores à metodologia utilizada neste trabalho, um teste inicial foi realizado com o parental MT, sensível à auxina, e o micro-*dgt*, que apresenta pouca sensibilidade a esse hormônio. O MT apresentou aumento gradativo na expansão celular com o aumento na concentração de auxina, apresentando um decréscimo em concentrações elevadas. Para o micro-*dgt*, foram necessárias concentrações elevadas de auxina para promover um aumento pouco significativo no tamanho do pecíolo (Figura 8).

Posteriormente foi realizado um teste de sensibilidade com MT, micro-*dgt* e micro-*brt*, no qual as curvas para o MT e o micro-*dgt* foram confirmadas. Houve uma expansão crescente dos pecíolos do MT à medida que a concentração de auxina foi aumentada, até que a concentração de 100 μ M promoveu a inibição na expansão dos pecíolos (Figura 13). A curva do micro-*brt* apresentou-se praticamente igual à do micro-*brt* (Figura 9), o que sugere que há uma interação muito grande entre os hormônios auxina e citocinina, já que o mutante *brt* parece ser um mutante com pouca sensibilidade à citocinina, como veremos mais adiante. Além da clássica interação entre auxina e citocinina na organogênese (Skoog & Miller, 1957), sabe-se que cada um desses hormônios pode afetar o metabolismo (Catterou et al., 2002; Li et al., 1995) e sensibilidade do outro (Li et al., 1994). Desse modo, plantas transgênicas com

superprodução de citocininas tendem a ter níveis elevados de auxina (Binns, 1987) e em alguns casos possuem menor sensibilidade a esse último hormônio (Li et al., 1994). No entanto, até o momento, não há outros casos na literatura evidenciando que plantas pouco sensíveis a citocinina são pouco sensíveis também a auxina.

4.2.2 Teste de sensibilidade à citocinina

A sensibilidade do MT e dos mutantes foi testada com o uso de doses crescentes de TDZ. O melhor órgão para se observar a sensibilidade à citocinina é a raiz. Com o aumento na concentração de citocinina, houve uma inibição no crescimento radicular das plântulas MT (Figura 10). Isso pode ser explicado pela ação da citocinina que, em doses elevadas, inibe o crescimento radicular (Bollmark, M. & Eliasson, 1990), embora parte dessa resposta possa ser atribuída ao aumento na concentração de etileno (Bertell & Eliasson, 1992; Cary et al., 1995). No *micro-brt*, embora sua raiz seja *per se* menor que a do parental (Figura 2), essa permaneceu praticamente do mesmo tamanho em concentrações elevadas de TDZ (Figura 10). Um comportamento semelhante também pôde ser observado no hipocótilo desse mutante (Figura 10). Esses resultados sugerem fortemente que *brt* seja um mutante pouco sensível a citocininas, o que será melhor explorado adiante.

As curvas do *micro-gf* e *micro-lutescent* não indicam que esses mutantes estejam associados à sensibilidade à citocinina (Figuras 10 e 11). As curvas de sensibilidade do *micro-lutescent* foram muito similar às curvas do MT.

Figura 8 – Expansão de pecíolos do MT (sensível à auxina) e do mutante *dgt* (pouco sensível à auxina)

Figura 9 – Teste de sensibilidade à auxina utilizando pecíolos de MT, *dgt* e *brt*

Figura 10 – Variação no comprimento da raiz (acima) e do hipocótilo (abaixo) em plântulas MT, *brt* e *gf*, incubadas em diferentes concentrações da citocinina TDZ desde a germinação

Figura 11 – Variação no comprimento da raiz (acima) e do hipocótilo (abaixo) em plântulas MT e *lutescent*, incubadas em diferentes concentrações da citocinina TDZ desde a germinação

4.2.3 Teste de sensibilidade ao etileno

Até o momento, de todos os mutantes que foram discutidos neste trabalho, apenas o *dgt* e o *ls* foram relatados na literatura como mutantes hormonais, sendo respectivamente um mutante em auxinas e outro em giberelinas. O teste de sensibilidade à auxina confirmou que uma mutação no gene DGT confere pouca sensibilidade à esse hormônio e o teste de sensibilidade à citocinina indica que o *brt* pode ser um mutante com pouca sensibilidade à essa classe hormonal. Para descartar ou confirmar a hipótese de que um desses mutantes esteja relacionado à sensibilidade ao etileno, um teste foi realizado utilizando-se MT, *lutescent*, *brt*, *gf*, como controle, o mutante *Never ripe* (*Nr*). O mutante *Nr* é insensível ao etileno e, dessa forma, os frutos não amadurecem. Seu fenótipo é resultante de uma mutação no receptor de etileno, codificada pelo gene *NR* (Hackett et al., 2000).

Para se observar a sensibilidade ao etileno, a raiz é também o melhor órgão, assim como para citocinina. Um conhecido efeito do etileno em plântulas crescidas no escuro é a chamada tríplice resposta, a qual em tomateiro inclui inibição e intumescimento do hipocótilo, inibição no alongamento da raiz e aumento do gancho plumular. As raízes do mutante *Nr* não têm o crescimento inibido, já que são insensíveis ao etileno, diferentemente do que ocorre com plantas do tipo selvagem (Figura 14). Somente concentrações altas de etileno promovem a inibição no crescimento da raiz desse mutante.

Além do MT, os demais mutantes (*lutescent*, *brt* e *gf*) apresentam sensibilidade ao etileno (Figura 12). Esses resultados descartam a hipótese de que os mutantes *gf*, *brt* e *lutescent* possuam alterações na sensibilidade a etileno.

Figura 12 – Variação no comprimento da raiz (acima) e do hipocótilo (abaixo) em plântulas incubadas em diferentes concentrações de etileno (CEPA) desde a germinação

Figura 13 – Expansão de segmentos de pecíolo incubados em solução contendo diferentes concentrações de AIA (0, 0.1, 1, 10 e 100 μM)

Figura 14 – Efeito do etileno no crescimento da raiz: inibição no MT e não-inibição no mutante *Nr*. Foto gentilmente cedida por Rogério Falleiros Carvalho

4.2.4 Obtenção de um mutante em auxina no porte micro

Durante a realização deste trabalho, foi possível obter um mutante em auxina no porte micro (Figura 6A). Trata-se do mutante *diageotropica*, que na verdade, já havia sido descrito como um mutante com baixa sensibilidade à auxina (Kelly & Bradford 1986, Muday et al. 1995). Essa mutação foi introgridida na cultivar Micro-Tom, resultando em plantas *dgt* com porte micro, o que pode facilitar estudos fisiológicos posteriores para essa classe hormonal. Apesar de o parental *dgt* ser caracterizado como uma planta anã, isso não foi observado em plantas micro-*dgt*, as quais possuem o caule alongado e estreito. Isso pode ser explicado pelo balanço energético da planta. A energia não gasta no engrossamento do caule foi direcionada para a expansão das células do caule, resultando em plantas mais altas do que o parental MT (Figura 6A).

4.2.5 Obtenção de um mutante em citocinina no porte micro

Até o momento, nenhum mutante em citocinina foi descrito em tomateiro. Como foi visto anteriormente, no item 4.2.2, o mutante *brt* parece apresentar pouca sensibilidade à citocinina. Para confirmar essa hipótese, outros parâmetros que podem ser influenciados pela citocinina foram testados. Desse modo, foram medidos peso de sementes, peso fresco de calos e área foliar.

Nossos resultados evidenciam que sementes do parental MT são maiores do que as sementes do mutante *brt* (Figura 15). Como as sementes são drenos e as citocininas são necessárias para o estabelecimento dos mesmos (Roitsch & Ehneß, 2000), esses resultados corroboram a hipótese de uma menor sensibilidade à citocinina nesse mutante.

A parte aérea do mutante *brt* é menos desenvolvida, e isso pode ser evidenciado em plântulas com 30 dias (Figura 1D). Conseqüentemente, a área foliar também é menor no mutante (Figura 17). Como as citocininas são necessárias para a divisão celular (Skoog & Miller, 1957), o tamanho do órgão (neste caso, a folha) é limitado por esse processo. Se o mutante é pouco sensível à citocinina, a divisão celular

é reduzida, resultando em folhas menores. Vale lembrar que o efeito das citocininas na expansão foliar tem um importante papel na fotomorfogênese, fazendo com que plantas estioladas possuam folhas menores que as crescidas no claro, as quais aproveitarão melhor a luz disponível para a fotossíntese. De modo semelhante à lâmina foliar, calos do mutante *brt*, formados na extremidade de segmentos de hipocótilo cultivados *in vitro* na presença de 5 μ M de BAP, possuem uma massa fresca significativamente menor, indicando que possivelmente suas células se dividem menos (Figura 16).

A somatória dos resultados discutidos acima sugere fortemente que o mutante *brt* é um mutante pouco sensível à citocinina. Esse tipo de mutação, a despeito de sua importância para a compreensão do modo de ação das citocininas, é inédita em tomateiro e mesmo em *Arabidopsis* ainda é pouco relatada. Basicamente o único mutante insensível à citocinina conhecido em *Arabidopsis* é o *cre1*, o qual foi discutido no item 2.3.1.

Figura 15 – Sementes do parental MT e do mutante *brt*. Notar que as sementes do mutante *brt* são expressivamente menores que as sementes do MT (A). Isso pode também ser evidenciado pelo peso das sementes (B)

Figura 16 – Peso médio de calos frescos de MT, *dgt* e *brt*

Figura 17 – Área foliar da primeira e quarta folhas do MT e do mutante *brt*

4.3 Testes de regeneração *in vitro* de um mutante em auxina e um mutante em citocinina

O parental MT e os mutantes hormonais na classe das auxinas e citocininas, *dgt* e *brt* respectivamente, foram testados quanto à sua capacidade de regeneração *in vitro*, utilizando segmentos de hipocótilo, explantes cotiledonares e segmentos de raiz.

Raízes de tomateiro foram os primeiros órgãos cultivados *in vitro* com sucesso nos trabalhos clássicos de White (1934). A espécie selvagem *Lycopersicon peruvianum* possui alta capacidade organogênica, regenerando brotos caulinares a partir de raízes (Koornneef et al., 1993). Outros genótipos também foram descritos por sua habilidade de formar brotos caulinares em calos derivados de hipocótilos (*L. pimpinellifolium* WV700, Faria & Illg, 1996), cotilédones (*L. esculentum* cv. UC82B, Hamza & Chupeau, 1993), células em suspensão (*L. esculentum* cv. VFNT, Meredith, 1979) e protoplastos (*L. esculentum* cv. Lukullus, Morgan & Cocking, 1982).

4.3.1 Regeneração a partir de segmentos de hipocótilo

Mutantes que superproduzem citocinina, como o *amp1*, apresentam elevadas taxas de regeneração *in vitro* (Chaudhury et al., 1993). Na cultura de tecidos, o balanço AIA/Cks tem uma importante função na morfogênese, sendo que um balanço favorável à citocinina favorece a formação de brotos caulinares (Skoog & Miller, 1957). Em plantas transgênicas onde os níveis de citocinina foram aumentados pela expressão do gene *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens*, brotos caulinares foram formados na região onde havia maior concentração de citocinina (Li et al., 1992). Ao contrário de mutantes ou plantas transgênicas que superproduzem citocinina, o mutante *brt* apresenta pouca sensibilidade a esse hormônio. Dessa forma, pode-se esperar que a taxa de regeneração desse mutante seja menor que no MT. No presente estudo, a taxa de regeneração em segmentos de hipocótilo foi maior no MT, seguida pelo mutante *brt* e finalmente pelo mutante *dgt* (Figura 18).

Houve um intumescimento na região basal de cada segmento de hipocótilo (Figura 20A, 20D e 20G). Isso se deve ao acúmulo de auxina nessa região. Aung et al.

(1975) observaram um acúmulo de auxinas nos cotilédones e na região basal de hipocótilos de plântulas de tomateiro. Em 1978, Ohki et al., estudando a capacidade de regeneração de hipocótilos de tomateiro (*L. esculentum* Mill.), constataram um incremento na resposta morfogênica *in vitro* na região basal do hipocótilo, em decorrência do acúmulo natural de auxinas nessa região. De acordo com essas observações e, por se tratar de um mutante com pouca sensibilidade à auxina, há coerência em nossos resultados, onde o mutante *dgt* apresentou a menor taxa de formação de gemas para esse tipo de explante.

4.3.2 Regeneração a partir de explantes cotiledonares

O parental MT e o mutante *dgt* apresentaram as mesmas taxas de regeneração a partir de explantes cotiledonares: média de 2,85% de explantes com gemas (Figura 19). Porém, essas taxas são muito baixas quando comparadas com outros trabalhos. Nogueira et al. obtiveram altas taxas de regeneração *in vitro* em explantes cotiledonares da cultivar Santa Clara (*Lycopersicon esculentum*) e do mutante natural *Firme*: acima de 60% (Nogueira et al., 2001). Explantes cotiledonares da cultivar Msk introgridida no porte micro (*L.esculentum* cv Msk x *L.esculentum* cv Micro-Tom) apresentaram cerca de 40% de regeneração (Lima et al., 2004). Düzyaman et al. verificaram que explantes cotiledonares apresentam maior taxa de regeneração do que explantes de hipocótilo, utilizando as cultivares Rio Grande e Brigade de tomateiro. Além disso, outros fatores como a posição do explante e a adição de auxinas e citocininas no meio de cultura também influenciam a regeneração (Düzyaman et al., 1994). Houve formação de calos em praticamente todos os explantes cotiledonares dos 3 genótipos, mas apenas os explantes do parental MT (Figura 20B) e do mutante *dgt* (Figura 20E) apresentaram formação de gemas. No mutante *brt* ocorreu apenas a formação de calos (Figura 20H).

4.3.3 Regeneração a partir de segmentos de raiz

Não houve formação de gemas caulinares adventícias nos explantes radiculares dos 3 genótipos testados: MT, *dgt* e *brt*. Apesar de os primeiros órgãos cultivados *in vitro* com sucesso em tomateiro terem sido raízes (White, 1934), esse tipo de explante apresenta uma capacidade de regeneração muito pequena (Peres et al., 2001). Essa perda da capacidade organogênica de *L. esculentum* tem limitado a regeneração de plantas transgênicas a partir de 'hairy roots' induzidas por *Agrobacterium rhizogenes* (Peres et al., 2001). A capacidade organogênica de *L. esculentum* pode ser recuperada a partir do cruzamento com espécies selvagens que possuem genes de regeneração, como o *Rg1* e o *Rg2*. A introgressão desses genes, oriundos de *L. peruvianum*, em *L. esculentum*, resultou na cultivar Msk (*L. esculentum* cv Msk), que apresenta alta capacidade organogênica a partir de explantes radiculares (Koornneef et al., 1986). Posteriormente, Koornneef et al. (1993) evidenciaram que basta o gene *Rg1* para conferir capacidade de regeneração a partir de explantes radiculares. Peres et al. (2001) obtiveram as melhores respostas na regeneração de brotos caulinares a partir de segmentos de raiz utilizando *L. chilense* e *L. peruvianum*. A não regeneração dos segmentos de raiz, a partir dos genótipos utilizados neste trabalho, pode ser atribuída à ausência do gene *Rg1*.

Figura 18 – Regeneração *in vitro* em segmentos de hipocótilo

Figura 19 – Regeneração *in vitro* em explantes cotilédonares

Figura 20 – Regeneração *in vitro* em segmentos de hipocótilo (A, D, G), explantes cotiledonares (B, E, H) e segmentos de raiz (C, F, I) do parental Micro-Tom (A, B, C) e dos mutantes *diageotropica* (D, E, F) e *bushy root* (G, H, I). Nos segmentos de hipocótilo, as gemas adventícias sempre se formaram no lado oposto à formação de calos, caracterizando uma organogênese direta

4.4 O papel do balanço auxina/citocinina na competência para regeneração

É de amplo conhecimento que o padrão de regeneração é dependente do estabelecimento de um balanço hormonal endógeno (Peres & Kerbauy, 1999), sendo as concentrações exógenas utilizadas (Skoog & Miller, 1957) apenas uma indicação indireta disso (Peres et al., 1999). Os genes de metabolismo hormonal, os quais codificam enzimas de biossíntese e/ou degradação de hormônios, são os responsáveis por esse balanço. No esquema proposto por Christianson e Warnick (1988), discutido no item 2.4, as auxinas atuam na desdiferenciação do explante, processo este que é necessário para que ocorra a aquisição de competência do explante. Depois dessa etapa, o balanço AIA/Cks será determinante no processo de indução. Além dos genes de metabolismo hormonal, essas etapas do processo organogênico são controladas também por genes de sensibilidade hormonal, os quais estão envolvidos na percepção e transdução de sinal para auxinas e citocininas (Peres, 2002).

Diferentemente do MT, os mutantes *dgt* e *brt* possuem uma sensibilidade ao balanço hormonal endógeno alterada. O mutante *dgt* possui pouca sensibilidade à auxina e, portanto, pode-se dizer que equivale a uma planta com balanço AIA/Cks favorável à citocinina. Assim, era esperado que esse mutante apresentasse maior regeneração de gemas caulinares. Porém, isso não ocorreu (Figura 19). Uma possível explicação seria a necessidade da auxina no processo de desdiferenciação. Como o mutante é pouco sensível a esse hormônio, a desdiferenciação do explante foi comprometida. O mutante *brt* possui pouca sensibilidade à citocinina e, portanto, equivale a um balanço AIA/Cks favorável à auxina. De modo coerente, não houve formação de gemas nos explantes cotiledonares desse mutante (Figura 19). A pouca sensibilidade à citocinina parece ter comprometido o processo de diferenciação celular desses explantes.

Para que haja regeneração de caules ou raízes, é necessário que ocorra os três processos celulares básicos de divisão, expansão e diferenciação, e não somente esse último. Tanto auxinas quanto citocininas são necessárias para esses três processos (Das et al., 1956; Zhang et al., 1996; Cleland, 1995; Skoog & Miller, 1957). Dessa forma, é razoável pensar que mutantes com alterações na sensibilidade ou

metabolismo dessas duas classes hormonais podem falhar na formação de qualquer tipo de órgão, já que a divisão e a expansão celular é um requisito tanto para formação de caules quanto de raízes. Nesse caso, o padrão de organogênese previsto pelo balanço AIA/Cks (Skoog & Miller, 1957) pode não ser totalmente válido para a interpretação dos resultados obtidos em mutantes hormonais, já que só prevê as alterações na diferenciação.

A somatória desses resultados leva a crer que o controle hormonal do desenvolvimento tem elementos de complexidade além dos já conhecidos e demanda estudos mais aprofundados que as abordagens atuais. Tais estudos podem combinar tanto as facilidades do uso de mutantes, quanto o conhecimento do padrão de expressão gênica (e.g. "microarrays"), bem como as interações entre genes (e.g. uso de duplos mutantes), para se ponderar o efeito relativo dos hormônios em cada evento celular e seu impacto na regeneração.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- As mutações *dgt*, *brt*, *lutescent*, *gf*, *ls* e *bu* podem ser transferidas com sucesso dos parentais de *L. esculentum* para a cultivar MT, facilitando muito os estudos genéticos e fisiológicos da função dos genes mutados no desenvolvimento das plantas.
- Apesar do mutante *ls* ser caracterizado na literatura como mutante em giberelina, o mutante *bu* não parece ser mutado nessa classe hormonal e nem no balanço auxina/citocinina.
- Os mutantes *lutescent* e *gf*, apesar de possuírem alterações na senescência, não parecem ser relacionados à sensibilidade à citocinina ou etileno.
- Os mutantes *dgt* e *brt* foram caracterizados como mutantes com pouca sensibilidade à auxina e à citocinina, respectivamente, sendo a caracterização da mutação *brt* inédita e a única descrita em um modelo genético diferente de *Arabidopsis* para essa classe hormonal.
- A alteração da resposta ao balanço AIA/Cks nos mutantes *dgt* e *brt* afeta o processo de regeneração, porém os resultados sugerem uma interpretação mais complexa do que o modelo proposto por Skoog & Miller (1957). Tais resultados apontam para a necessidade de um estudo mais aprofundado do tema.

Desse modo, tem-se como perspectiva:

- Obtenção de novos mutantes, plantas transgênicas e a combinação de duplos mutantes em auxina e citocinina para elucidar o papel da interação entre esses hormônios no controle do desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S.; NGUYEN, M.D.; THEOLOGIS, A. The *PS-IAA4/5*-like family of early auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Molecular Biology**, v.251, p.533-549, 1995.
- AINLEY, W.M.; MCNEIL, K.J.; HILL, J.W.; LINGLE, W.L. SIMPSON, R.B.; BRENNER, M.L.; NAGAO, R.T.; KEY, J.L. Regulatable endogenous production of cytokinins up to "toxic" levels in transgenic plant and plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.13-23, 1993.
- AKHTAR, M.S.; GOLDSCHMIDT, E.E.; JOHN, I.; RODONI, S.; MATILE, P.; GRIERSON, D. Altered patterns of senescence and ripening in *gf*, a stay-green mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.1115-1122, 1999.
- AUNG, L.H.; BRYAN, H.H.; BYRNE, J.M. Changes in rooting substances of tomato explants. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.100, n.1, p.19-22, 1975.
- BALBI, V.; LOMAX, T.L. Regulation of early tomato fruit development. **Plant Physiology**, v.131, p.186-197, 2003.

- BANDURSKI, R.S.; COHEN, J.D.; SLOVIN, J.P.; REINECKE, D.M. Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P. (Ed.). **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.39-65.
- BANNO, H.; IKEDA, Y.; NIU, Q-W., CHUA, N-H. Overexpression of *Arabidopsis ESR1* induces initiation of shoot regeneration. **Plant Cell**, v.13, p.2609-2618, 2001.
- BARTEL, B. Auxin Biosynthesis. **Annual Review Plant Physiology**, v.48, p.51-67, 1997.
- BARTEL, B; FINK, G.R. IRL1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. **Science**, v.268, p.1745-1748, 1995.
- BENNETT, M.J.; MARCHANT, A.; GREEN, H.G.; MAY, S.T.; WARD, S.P.; MILLNER, P.A.; WALKER, A.R.; SCHULZ, B.; FELDMANN, K.A. *Arabidopsis AUX1* Gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. **Science**, v.273, p.948-950, 1996.
- 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**, v.9, p.237-242, 1990.
- BERTELL, G.; ELIASSON, L. Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. **Physiologia Plantarum**, v.84, p.255-261, 1992.
- BERTRAM, L.; LERCARI, B. Phytochrome B1 control the acquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotyls. **Plant Cell Reports**, v.19, p.604-609, 2000.

- BINNS, A.N. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.45, p.173-196, 1994.
- BINNS, A.N.; LABRIOLA, J.; BLACK, R.C. Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokinin-biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. **Planta**, v.171, p.539-548, 1987.
- 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 the National Academy of Sciences**, v.96, p.1761-1766, 1999.
- BOERJAN, W.; CERVERA, M.T.; DELARUE, M.; BEECKMAN, T.; DEWITTE, W.; BELLINI, C.; CABOCHE, M.; ONCKELEN, H.V.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. **Plant Cell**, v.7, p.1405-1419, 1995.
- BOLLMARK, M.; ELIASSON, L. A rooting inhibitor present in norway spruce seedling grown at high irradiance - a putative cytokinin. **Physiologia Plantarum**, v.80, p.527-533, 1990.
- BORTOLOTTI, S.; BOGGIO, S.B.; DELGADO, L.; ORELLANO, E.G.; VALLE, E.M. Different induction patterns of glutamate metabolizing enzymes in ripening fruits of the tomato mutant *green flesh*. **Physiologia Plantarum**, v.119, p.384-391, 2003.
- 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**, v.17, p.427-431, 1999.

- CATTEROU, M.; DUBOIS, F.; SMETS, R.; VANJET, S.; KICHEY, T.; ONCKELEN, H.V.; SANGWAN-NORREEL, B.; SANGWAN, R.S. *hoc*: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high in vitro oranonogenic capacity. **Plant Journal**, v.30, p.273-287, 2002.
- CARVALHO, R.F. Uso de mutantes fotomorfogénéticos no estudo da competência para regeneração in vitro em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). Piracicaba, 2004. 69p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, v.213, p.700-707, 2001.
- CARY, A.J.; LIU, E.; 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**, v.107, p.1075-1082, 1995.
- CHAUDHURY, A.M.; LETHAM, S.; CRAIG, S.; DENNIS, E.S. *amp1* – a mutant with high cytokinins levels and altered embryogenic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowerin. **Plant Journal**, v.4, p.907-916, 1993.
- CHEN, C.M.; PETSCHOW, B. Cytokinin biosynthesis in cultured rootless tobacco plants. **Plant Physiology**, v.62, p.861-865, 1978.
- CHRISTIAN, M.; LÜTHEN, H. New methods to analyse auxin-induced growth I: Classical auxinology goes *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v.32, p.107-114, 2000.

- CHRISTIAN, M.; STEFFENS, B.; SCHENCK, D.; LÜTHEN, H. The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signaling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. **Planta**, v.218, p.309-314, 2003.
- CHRISTIANSON, M. L.; WARNICK, D. A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, v.23, p.515-519, 1988.
- CLELAND, R.E. Auxin and cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publi., 1995, p.214-225.
- COENEN, C; LOMAX, T.L. The *diageotropica* gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. **Plant Physiology**, v.117, p.63-72, 1998.
- COENEN, C.; BIERFREUND, N.; LÜTHEN, H.; NEUHAUS, G. Developmental regulation of H⁺-ATPase-depedent auxin responses in the *diageotropica* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Physiologia Plantarum**, v.114, p.461-471, 2002.
- COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annual Review Plant Physiology**, v.33, p.403-430, 1982.
- DANIEL, S.G; RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. Auxin physiology of the tomato mutant *diageotropica*. **Plant Physiology**, v.91, p.804-807, 1989.
- DAS, N.K.; PATAU, K.; SKOOG, F. Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue. **Physiologia Plantarum**, v.9, p.640-651, 1956.

- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Acad. Publi., 1995, p.1-12.
- DELBARRE, A.; MULLER, P.; IMHOFF, V.; BARBIER-BRYGOO, H.; MAUREL, C.; LEBLANC, N.; PERROT-RECHENMANN, C.; GUERN, J. The rolB gene of *Agrobacterium rhizogenes* does not increase the auxin sensitivity of tobacco protoplasts by modifying the intracellular auxin concentration. **Plant Physiology**, v.105, p.563-569, 1994.
- DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M. Auxin signaling and regulated protein degradation. **Trends in Plant Science**, v.9, p.302-308, 2004.
- DÜZYAMAN, E.; TANRISEVER, A.; GÜNVER, G. Comparative studies on regeneration of different tissues of tomato *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v.366, p.235-242, 1994.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.112-117, 2002.
- ESTRUCH, J.J.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H.; SCHELL, J.; SPENA, A. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. **Science**, v.254, p.1364-1367, 1991.
- FARIA, R.T.; ILLG, R.D. Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. **Revista Brasileira de Genética**, v.19, p.113-116, 1996
- FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic, 1994, 580p.

- FUJINO, D.W.; NISSEN, S.J.; JONES, A.D.; BURGER, D.W.; BRADFORD, K.J. Quantification of indole-3-acetic acid in dark-grown seedlings of the *diageotropica* and *epinastic* mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Physiology**, v.88, p.780-784, 1988.
- GILLESSEN, L.J.W.; VAN STAVEREN, M.J.; HAKKERT, J.C.; SMULDERS, M.J.M. Competence for regeneration during tobacco internodal development. **Plant Physiology**, v. 111, p. 1243-1250, 1996.
- GROOT, S.P.C.; KEIZER, L.C.P.; DERUITER, W.; DONS, J.J.M. Seed and fruit-set of the Lateral suppressor mutant of tomato. **Scientia Horticulturae**, v.59, p.157-162, 1994.
- GUILFOYLE, T.; HAGEN, G.; ULMASOV, T.; MURFETT, J. How does auxin turn on genes? **Plant Physiology**, v.118, p.341-347, 1998.
- HABERER, G.; KIEBER, J.J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. **Plant Physiology**, v.128, p.354-362, 2002.
- HACKETT, R.M.; HO, C.W.; LIN, Z.F.; FOOTE, H.C.C.; FRAY, R.G.; GRIERSON, D. Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. **Plant Physiology**, v.124, p.1079-1085, 2000.
- HAMZA, S.; CHUPEAU, Y. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.1837-1845, 1993.
- HARE, P.D.; VAN STADEN, J. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. **Physiologia Plantarum**, v.91, p.128-136, 1994.

- HELLIWELL, C.A.; CHIN-ATKINS, A.N.; WILSON, I.W.; CHAPPLE, R.; DENNIS, E.S.; CHAUDHURY, A. The *Arabidopsis* *AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. **Plant Cell**, v.13, p.2115-2125, 2001.
- HICKS, G.R.; RAYLE, D.L.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, v.245, p.52-54, 1989.
- HONG, S.J.; LEE, S.K. Changes in endogenous plant hormones during ripening of tomato fruits. **Acta Horticulturae** (ISHS), v.343, p.220-224, 1993.
- HORGAN, R.; SCOTT, I.M. Cytokinins. In: RIVIER, L.; CROZIER, A. (Ed.) **Principles and practice of plant hormone analysis**, v.1. London: Academic Press, 1987. p.303-365. (Biological Techniques Series)
- HOUBA-HÉRIN, N.; PETHE, C.; D'ALAYER, J.; LALOUE, M. Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. **Plant Journal**, v.17, p.615-626, 1999.
- INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHY, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, v.409, p.1060-1063, 2001.
- JACKSON, D. The long and the short of it: signaling development through plasmodesmata. **Plant Cell**, v.13, p.2569-2572, 2001.
- KAKIMOTO, T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. **Plant Cell Physiology**, v.42, p.677-685, 2001.
- KELLY, M.O.; BRADFORD, K.J. Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, v.82, p.713-717, 1986.

KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. (Ed.). **Photomorphogenesis in plants**. 2.ed. Dorrecht: Academic Publishers, 1994. p.601-628.

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**, v.2, p.85-98, 2000.

KOORNNEEF, M.; HANHART, C.; JONGSMA, M.; TOMA, I.; WEIDE, R.; ZABEL, P.; HILLE, J. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation. **Plant Science**, v.45, p.201-208, 1986.

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**, v.80, p.852-857, 1990.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEI, J.; SOPPE, W.; VERKERK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, v.3, p.131-141, 1993.

LETHAM, D.S.; PALNI, M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annual Review Plant Physiology**, v.34, p.163-197, 1983.

LI, Y.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. **Developmental Biology**, v.153, p.386-395, 1992.

LI, Y.; SHI, X.; STRABALA, T.J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins show increased tolerance to exogenous auxin and auxin transport inhibitors. **Plant Science**, v.100, p.9-14, 1994.

- LI, C.J.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. **Physiologia Plantarum**, v.94, p.465-469, 1995.
- 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**, v.167, p.753-757, 2004.
- LING, H.-Q.; BAUER, P.; BEREZKY, Z.; KELLER, B.; GANAL, M. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. **Plant Biology**, v.99, p.13938-13943, 2002.
- LIPUCCI DI PAOLA, M.; COLLINA, G.F.; SCALA, A. Shoot forming ability of *Lycopersicon esculentum* Mill. Varieties by in vitro cultured cotyledons. **Acta Horticulturae**, v.131, p.111-116, 1983.
- LIU, C.; XU, Z.; CHUA, N.-H. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. **Plant Cell**, v.5, p.621-630, 1993.
- LJUNG, K.; HULL, A.K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J.D.; SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v.50, p.309-332, 2002.
- MADLUNG, A.; BEHRINGER, F.J.; LOMAX, T.L. Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. **Plant Physiology**, v.120, p.897-906, 1999.
- MALAYER, J.C.; GUARD, A.T. Comparative developmental study of mutant sideshootless + normal tomato plants. **American Journal of Botany**, v.51, p. 140-143, 1964.

- MARTIN, R.C.; MOK, M.C.; MOK, D.W.S. A gene encoding cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.120, p.553-557, 1999a.
- MARTIN, R.C.; MOK, M.C.; MOK, D.W.S. Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v.96, p.284-289, 1999b.
- MEDFORD, J.I.; HORGAN, R.; EL-SAWI, Z.; KLEE, H. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Cell**, v.1, p.403-413, 1989.
- MEINS JUNIOR, F.; BINNS, N.A. Cell determination in plant development. **BioScience**, v.29, p.221-225, 1979.
- MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, v.12, p.1465-1472, 1997.
- MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, p.107-112, 2003.
- MEREDITH, C.P. Shoot development in established callus cultures of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.95, p.405-411, 1979.
- MITO, N.; BENNETT, A.B. The *diageotropica* mutation and synthetic auxins differentially affects the expression of auxin-regulated genes in tomato. **Plant Physiology**, v.109, p.293-297, 1995.

MOK, M.C. **Cytokinins**: chemistry, activity and function. MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.) Boca Raton, FL: CRC, 1994. p.155-166.

MOK, D.W.; MARTIN, R.C.; SHAN, X.; MOK, M.C. Genes encoding zeatin Oglycosyltransferases. **Plant Growth Regulation**, v.32, p.285-287, 2000.

MOK, D.W.S; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.52, p.89-118, 2001.

MORGAN, A.; COCKING, E.C. Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculentum* Mill. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.106, p.97-104, 1982.

MUDAY, G.K.; LOMAX, T.L.; RAYLE, D.L. Characterization of the growth and auxin physiology of roots of the tomato mutant, *diageotropica*. **Planta**, v.195, p.548-553, 1995.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NEBENFÜHR, A.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* mutation alters auxin inducing of a subset of the *Aux/IAA* gene family in tomato. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.73-84, 2000.

NOGUEIRA, F.T.S.; COSTA, M.G.; FIGUEIRA, M.L.; OTONI, W.C.; FINGER, F.L. Regeneração in vitro de plantas de tomateiros 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.63-71, 2001.

NORMANLY, J.; SLOVIN, J.P.; COHEN, J.D. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. **Plant Physiology**, v.107, p.323-329, 1995.

- OHKI, S.; BIGOT, C.; MOSSEAU, J. Analysis of shoot-forming capacity *in vitro* in two lines of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and their hybrids. **Plant Cell Physiology**, v.19, p.27-42, 1978.
- PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas in vitro. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) . **Plant Cell Reports**, v.18, p.1002-1006, 1999.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ, p.250-278, 2004.
- PERES, L.E.P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G.B.; ZAFFARI, G.R. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinado por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.169-176, 1997.
- PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECCHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M.-A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.37-44, 2001.
- PERES, L.E.P.; AMAR, S.; KERBAUY, G.B.; SALATINO, A.; ZAFFARI, G.R.; MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p.551-555, 1999.

- PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; KELMENSEN, P.M.; LAZAROVA, G.I.; KUBOTA, T.; ALBA, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Plant, Cell and Environment**, v.20, p.672-677, 1997.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. p.650-673.
- RICE, M.S.; LOMAX, T.L. The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway. **Planta**, v.210, p.906-913, 2000.
- RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v.22, p.281-300, 1988.
- ROITSCH, T.; EHNEß, R. Regulation of source/sink relations by cytokinins. **Plant Growth Regulation**, v.32, p.359-367, 2000.
- RUPP, H-M.; FRANK, M.; WERNER, T.; STRNARD, M.; SCHMÜLLING, T. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. **Plant Journal**, v.18, p.557-563, 1999.
- SCHMÜLLING, T.; BEINSBERGER, S.; DE GREEF, J.; SCHELL, J.; VAN ONCKELEN, H.; SPENA, A. Construction of a heat-inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. **FEBS Letters**, v.249, p.401-460, 1989.
- SCHUMACHER, K.; SCHMITT, T.; ROSSBERG, M.; SCHMITZ, G.; THERES, K. The *Lateral suppressor* (*Ls*) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.290-295, 1999.

- SEO, M.; AKABA, S.; ORITANI, T.; DELARUE, M.; BELLINI, C.; CABOCHE, M.; KOSHIBA, T.; Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.116, p.687-693, 1998.
- SILVERSTONE, A.L.; SUN, T-P. Gibberellins and the green revolution. **Trends in Plant Science**, v.5, p.1-2, 2000.
- SITBON, F.; HENNION, S.; SUNDBERG, B.; LITTLE, C.H.A.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Transgenic tobacco plants coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens iaaM* and *iaaH* genes display altered growth and indoleacetic acid metabolism. **Plant Physiology**, v.99, p.1062-1069, 1992.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia Society of Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- SMIGOCKI, A.C. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. **Plant Molecular Biology**, v.16, p.105-115, 1991.
- 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.
- SU, W.; HOWELL, S.H. A single genetic locus, *ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. **Plant Physiology**, v.99, p.1569-1574, 1992.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1998, 792p.

- TAKEI, K.; SAKASIBARA, H.; SYGIYAMA, T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biology Chemistry.**, v.276, p.26405-26410, 2001.
- TAYLOR, I.B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A.J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.1563-1574, 2000.
- TIMPTE, C.; LINCOLN, C.; PICKETT, F.B.; TURNER, J.; ESTELLE, M. The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. **Plant Journal**, v.8, p.561-569, 1995.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DE VINCENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, F.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v.132, p.1141-1160, 1992.
- TIRYAKI, I.; STASWICK, P.E. An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. **Plant Physiology**, v.130, p.887-894, 2002.
- TUCKER, D.J. Endogenous growth regulators in relation to side shoot development in the tomato. **New Phytologist**, v.77, p.561-568, 1976.
- TUCKER, D. J. Apical dominance in the tomato: some further observations on isogenic lines showing varying degrees of side-shoot development. **Annals of Botany**, v.43, p.571-577, 1979.

- VAN STADEN, J.; SMITH, A.R. The synthesis of cytokinins in excised roots of maize and tomato under aseptic conditions. **Annals of Botany**, v.42, p.751-753, 1978.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNARD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.98, p.10487-10492, 2001.
- WHITE, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. **Plant Physiology**, v.9, p.585-600, 1934.
- WIKINSON, J.Q.; LANAHAAN, M.B.; YEN, H-C; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. **Science**, v.270, p.1807-1809, 1995.
- WILLIAMS, W. The effect of selection on the manifold expression of the "suppressed lateral" gene in the tomato. **Heredity**, v.14, p.285-296, 1960.
- ZHANG, K.; LETHAM, D.S.; JOHN, P.C.L. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. **Planta**, v.200, p.2-12, 1996.
- ZOBEL, R.W. Genetics of the *diageotropica* mutant in tomato. **Journal of Heredity**, v.63, p.91-97, 1972.
- ZOBEL, R.W. Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant *diageotropica*. **Plant Physiology**, v.52, p.385-389, 1973.
- ZOBEL, R. W. Genetic control of root systems. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A. (Eds). **Plant roots: the hidden half**. New York: Basel; Hong Kong: Marcel Dekker, 1991, p.27-38.