Tatiana Bistaco Farinha
Bióloga

Envolvimento da giberelina na regulação do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv Micro-Tom

Orientador:
Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Farinha, Tatiana Bistaco

Envolvimento da giberelina na regulação do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv Micro-Tom / Tatiana Bistaco Farinha. - - Piracicaba, 2008.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Desenvolvimento vegetal 2. Frutificação 3. Giberelina 4. Hormônios vegetais 5. Mutação vegetal 6. Reprodução vegetal 7. Tomate I. Título

CDD 635.642
F226e

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

**Ao Prof. Lázaro,
Pelos ensinamentos e apoio,
Obrigada!**

OFEREÇO

**Ao meu querido Toni,
pelo apoio, carinho e compreensão**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho, 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.

A Secretária do Programa, Maria Solizete, pela amizade e eficiência profissional. Valeu Sô! Beijo também a Luciane, secretária da Fitotecnia, sempre presente. Beijos Lú.

Ao grande amigo Dr. Enio Thiago de Oliveira, pelo tempo de estágio e ensinamentos no CEBTEC, além do incentivo a iniciar o mestrado.

A minha querida Jeanne Blanco de Molfeta Machado, pela receptividade, apoio e amizade. Saudades!!

Ao Prof. Dr. Antonio V.O. Figueira, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela utilização de seu laboratório.

Ao professor Ricardo Ferraz de Oliveira, pelos ensinamentos, incentivos, apoio e amizade. Muito obrigada!

Aos professores Murilo Melo, Ricardo A. Kluge e Beatriz Apezzatto da Glória, Luis Antonio Gallo pelas atividades e progressos realizados no Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, e também pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, Simone (sempre presente, um encanto, beijos Si), Lílian (obrigado pelos ensinamentos, você é “100%”), Rogério (aquele abraço), Mariana (só risadas, ou “nem...!”), Marcelo (alto astral, valeu “véio”!), Fernando (muita paciência), Clarissa, Juliana e Angélica. Muito obrigada a todos pelo trabalho em equipe, pelo apoio e ajuda, e especialmente pela amizade.

Aos técnicos da casa de vegetação, Miranda e Vitti, por toda ajuda na ordem e manutenção. Abraço também ao Romeu.

Aos amigos do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, e de outros programas que estiveram sempre presentes. Beijo especial a Flavinha, PPG da Fisiologia e Bioquímica de plantas.

Às amigas Camila, Fabiana pela oportunidade de tê-las como amigas e por todos os momentos compartilhados.

Aos meus pais Bete e Diógenes, pela paciência e apoio. Ao meu querido irmão Rafael pelos bons momentos e apoio.

Aos meus avós Rosa e Orlando, os quais fazem parte da minha vida de uma maneira muito especial.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo.

MUITO OBRIGADA

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESNVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão Bibliográfica.....	12
2.1.1 Tomateiro como modelo para estudo do desenvolvimento.....	12
2.1.1.1 Mutantes hormonais conhecidos em tomateiro.....	13
2.1.1.2 Modelo Micro-Tom.....	14
2.1.2 Principais etapas do desenvolvimento reprodutivo vegetal.....	15
2.1.2.1 Indução floral.....	16
2.1.2.2 Desenvolvimento do ovário.....	17
2.1.2.3 Frutificação em tomateiro.....	19
2.1.2.4 Frutificação e produtividade.....	21
2.1.3 Controle hormonal do desenvolvimento.....	23
2.1.3.1 Giberelinas.....	23
2.1.3.1.1 Biossíntese.....	23
2.1.3.1.2 Transdução de sinal de GA.....	27
2.1.3.1.3 Impacto de GA no desenvolvimento.....	29
2.1.3.1.4 Desenvolvimento reprodutivo de mutantes de GA em tomateiro.....	29
2.2 Objetivos.....	31
2.3 Material e Métodos.....	31
2.3.1 Material Vegetal.....	31
2.3.2 Cultivo em casa de vegetação.....	32
2.3.3 Coleta e processamento das sementes.....	33
2.3.4 Efeito de giberelina (GA) no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro.....	33
2.3.5 Aplicação de paclobutrazol (paclo) em diferentes estágios do desenvolvimento.....	33
2.3.6 Aplicação de GA em diferentes estágios de desenvolvimento.....	34

2.3.7 Análise comparativa dos efeitos da aplicação de GA e paclo.....	35
2.4 Resultados.....	36
2.4.1 Efeito da giberelina no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro.....	36
2.4.2 Efeito da aplicação de paclobutrazol no crescimento e frutificação de tomateiro.....	38
2.4.2.1 Crescimento vegetativo e indução floral.....	38
2.4.2.2 Frutificação.....	43
2.4.3 Efeito da aplicação de giberelina no crescimento e frutificação de tomateiro.....	46
2.4.3.1 Crescimento vegetativo e indução floral.....	46
2.4.3.2 Frutificação.....	49
2.4.4 Comparação dos efeitos da aplicação de paclo e GA no crescimento e frutificação de tomateiro.....	51
2.4.4.1 Crescimento vegetativo e indução floral.....	51
2.4.4.2 Frutificação.....	54
2.5 Discussão.....	56
3 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Envolvimento da giberelina na regulação do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv Micro-Tom

As giberelinas (GAs) são bem conhecidas pelo seu papel no alongamento do caule, germinação de sementes, desenvolvimento dos frutos e florescimento em plantas de dia longo. Apesar de boa parte das plantas de interesse agrônomo não possuírem resposta fotoperiódica, há poucos estudos sob a possibilidade dessa classe hormonal estar envolvida em processos de florescimento e frutificação em plantas de dia neutro, como é o caso do tomateiro. O principal objetivo do trabalho foi avaliar a importância da via de indução por giberelina para o crescimento vegetativo e reprodutivo em *Solanum lycopersicum* cv Micro-tom (MT). Para tal, foram utilizados tratamentos exógenos com GA ou um inibidor de sua síntese, paclobutrazol (paclo), em diferentes estágios do desenvolvimento de MT. Os mutantes *pro* e *gib3*, os quais são supersensíveis e deficientes a GA, respectivamente, também foram utilizados para análises comparativas. Avaliou-se o tempo para 50% das plantas apresentarem botões florais visíveis a olho nu, tempo para antese, altura e número de entrenós na antese, número de frutos, massa média e total dos frutos e brix. O tratamento com 5 aplicações de paclo ao longo do ciclo levou a uma extensão do desenvolvimento vegetativo, com um atraso significativo na floração. No tratamento que recebeu aplicação de paclo 16 dias após semeadura, mesmo com a planta apresentando uma redução na altura, houve um restabelecimento de seu desenvolvimento reprodutivo, tornando este superior ao controle em termos de tamanho do fruto. Para o tratamento com aplicação de GA aos 16 dias, obteve-se um aumento no brix comparado ao controle. Por outro lado, o mutante *procera*, por possuir um crescimento vegetativo (altura e número de entrenós na antese) bem superior ao controle MT, teve seu crescimento reprodutivo prejudicado. Estes resultados nos levaram a concluir que embora GA possa induzir diretamente o florescimento e a frutificação de tomateiro, ela também pode reprimir esses processos, provavelmente deslocando o dreno para o crescimento vegetativo. Sendo assim, tanto a aplicação de GA quanto de paclo, se feitas em determinado estágio do desenvolvimento, podem melhorar a qualidade do fruto de tomateiro, aumentando o tamanho dos frutos ou o brix.

Palavras-chave: Tomate; Giberelina; Paclobutrazol; Florescimento; Frutificação; Produtividade; Hormônios; Mutantes

ABSTRACT

Involvement of gibberellin in regulating of vegetative and reproductive growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cv Micro-Tom

The gibberellins (GAs) are well known for their roles in stem elongation, seed germination, fruit development and flowering induction in long day plants. Despite the fact that many plants of agronomic interest do not respond to photoperiod, there are few studies about the possibility of this hormonal class to be involved in the process of flowering and fruit formation in photoperiod-insensitive plants, such as tomato. The main objective of this study was to evaluate the importance of the GA induction pathway for the vegetative and reproductive growth of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom (MT). To accomplish this, we performed exogenous application of GA, or an inhibitor of its biosynthesis, paclobutrazol (paclo), at different stages of MT development. The mutants *pro* and *gib3*, which are hypersensitive and deficient in GA, respectively, were also used for comparative analysis. It was evaluated the time spent for 50% of plants presenting visible flower buds, the time to anthesis, plant height and the number of internodes at anthesis, number of fruits, total and individual fruit weight and fruit brix. The treatment that received five paclo applications during the life cycle presented stunted vegetative growth, which also reflected in a significant flowering delay. In the treatment that received paclo at 16th day after sowing, there was a reduction in plant height, but its reproductive development was resumed yielding fruit size superior to the control. Conversely, the treatment that received GA at 16th presented fruits with higher brix, compared to the control. Furthermore, the mutant *pro*, which had a vegetative growth higher than the control (in terms of plant height and number of internodes at anthesis), showed a reduced reproductive growth. These results drove us to the conclusion that although GA can directly induce flower and fruit development in tomato, it also can arrest these processes, probably redirecting the sink for vegetative growth. Thus, both GA and paclo applications, if made in a certain stage of plant development, can improve the quality of tomato fruit, increasing fruit size or brix.

Keywords: Tomato; Gibberellin; Paclobutrazol; Flowering; Fruit formation; Productivity; Hormones; Mutants

1 INTRODUÇÃO

Na América do Sul, o Brasil é o principal produtor de tomate, seguido por Chile e Argentina (MELO, 2001). O mercado brasileiro de tomate industrial, de cultivo rasteiro, destinado à produção de purês, molhos prontos, extratos, sucos etc., é avaliado em US\$ 445 milhões anuais (NAKAMAE; PASTRELLO, 1999). Estimativas mostram que o consumo de polpa de tomate passou de 95 mil toneladas, em 1994, para 140 mil toneladas em 1998 (NAKAMAE; PASTRELLO, 2000). No novo cenário de produção do Brasil Central, o tomate vem sendo cultivado por empresas agrícolas de grande porte, ou seja, empresas com mais de 500 ha, as quais utilizam-se de um sistema de manejo tecnologicamente avançado, visando economia de custos e alto rendimento. Neste sistema, a maior parte das operações culturais é mecanizada, incluindo plantio e colheita. Na Tabela 1 se encontram a situação das hortaliças no Brasil e a posição da produção de tomate em 2006.

Tabela 1 - Produção das hortaliças no Brasil em 2006, área cultivada e produtividade

Situação das Hortaliças no Brasil			
Hortaliças	Produção (mil t)	Área (mil ha)	Produtividade (t/ha)
Batata	3.125,93	140,80	22,20
*Tomate	3.278,07	56,64	57,88
Cebola	1.174,75	57,21	20,53
Batata-doce	513,65	45,33	11,33
Cenoura	750,05	25,55	29,36
Alho	87,75	10,46	8,39
Inhame	236,00	25,74	9,17
Melão	500,00	21,37	23,40
Melancia	1.505,13	80,64	18,66
Outras	6.378,34	305,57	20,87
Total	17.549,67	769,31	221,79

*Inclui tomate para mesa e processamento

Fonte: IBGE – Produção Agrícola Municipal, 2007

Dentre os atributos mais vantajosos listados pelos produtores de tomate, em primeiro lugar é citado cultivares com alta produção, além de outras características

como maturação concentrada dos frutos, que facilita a colheita mecanizada, alta capacidade de armazenamento dos frutos na planta e resistência múltipla a doenças.

Diante de um cenário em que o tomateiro é um dos vegetais mais importantes, levando-se em conta principalmente a produção e o consumo no mundo, e que o desenvolvimento vegetal é regulado pela interação de fatores ambientais e endógenos como, por exemplo, os hormônios, tornam-se necessários estudos para aumentar a produtividade de tomate e conseqüentemente o lucro dos produtores. Desta forma, muitos esforços têm sido feito para seu melhoramento, seja através de seleção pela genética clássica, técnicas biotecnológicas, ou simples aplicação de produtos para aumentar a produtividade. Aplicação exógena de hormônios ou inibidores de sua biossíntese tem se mostrado uma forma eficaz, rápida e barata para melhorar o desenvolvimento da planta. A fim de estudar melhor o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro, já que poucos estudos têm sido feitos, foram feitas aplicações de GA₃ e paclobutrazol (paclo), inibidor da biossíntese de GA, em diferentes fases do desenvolvimento de plantas de Micro-Tom (MT).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Tomateiro como modelo para estudo do desenvolvimento

A utilização extensiva de mutantes em estudos de fisiologia vegetal é relativamente recente (KOORNNEEF et al., 1997), porém, uma rápida expansão na utilização destas ferramentas pode ser observada nos últimos anos.

O tomateiro é talvez uma das espécies de interesse agrônomo em que se conhece o maior número de mutantes e variações genéticas naturais (STEVENS; RICK, 1986). Além disso, essa espécie constitui-se também em um modelo de grande importância, pois possui uma série de características do desenvolvimento não presentes em *Arabidopsis*, tais como ausência de crescimento em roseta, florescimento simpodial e independente do fotoperíodo, bem como a presença de frutos carnosos e climatéricos.

Como *Arabidopsis*, o tomateiro possui um genoma relativamente pequeno (950 Mb), mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (RICK; YODER, 1988; TANKSLEY et al., 1992), uma ampla riqueza de germoplasma constituída por nove espécies selvagens de *Solanum* (seção *Lycopersicon*) que podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (STEVENS; RICK, 1986) e poucas seqüências repetitivas de DNA (ZAMIR; TANKSLEY, 1988), características que facilitam o conhecimento das estruturas genômicas. Além disso, o tomateiro é uma espécie cultivada de grande importância econômica, e apresenta frutos carnosos, o que possibilita estudo sobre o desenvolvimento desse tipo de órgão (HONG; LEE, 1993). Embora muitos genes importantes podem ser isolados e caracterizados em *Arabidopsis*, o tomateiro possui vários genes de importância econômica, os quais não estão disponíveis em *Arabidopsis* (WING et al., 1994). Devido à capacidade de regeneração por hipocótilo e cotilédones, Lipucci DI Paola et al. (1983) destacam o tomateiro como um excelente modelo para estudos de cultura de tecidos in vitro.

2.1.1.1 Mutantes hormonais conhecidos em tomateiro

Entre os mutantes conhecidos em tomateiro, alguns estão relacionados com biossíntese (KOORNNEEF et al., 1990) e a sinalização de GA (JONES, 1987). Desse modo, o mutante *procera* (*pro*) mapeado no cromossomo 11 (VAN TUINEN et al., 1999) é um mutante de resposta constitutiva a GA e é caracterizado por apresentar um considerável aumento na altura da planta, alteração de sua morfologia foliar e vários outros fatores que são similares ao efeito da aplicação de giberelinas em plantas normais de tomateiro. Embora os níveis de GA₁ em *pro* sejam somente a metade do que se tem em plantas selvagens (JONES, 1987), a alteração citada acontece devido ao fato desse mutante ser super sensível ao GA. Plantas com aumento na estatura estão geralmente associadas com mutações recessivas em genes repressores do crescimento. Exemplos de tais mutações são *slender1* (*sln1*) de trigo (LANAHAN; HO, 1988) e *slender1* (*slr1*) de arroz (IKEDA et al., 2001). Todos esses genes codificam para proteínas DELLA, que são repressores da ação de GA localizadas no núcleo. Em tomateiro, um gene DELLA denominado *LeGAI* corresponde à mutação *pro* (BASSEL et al., 2004).

Os mutantes de tomateiro deficientes em GA relacionados a biossíntese, são representados pelos *loci gib-1*, *gib-2* e *gib-3*, mapeados nos cromossomos 6, 1 e 7 respectivamente, que mostram plantas com entrenós muito curtos, folhas reduzidas e encarquilhadas e baixa capacidade de germinação (KOORNNEEF et al., 1990). Os mutantes *gibberellin deficient-1* (*gib1*) e *gibberellin deficient-3* (*gib3*) são defectivos para os genes que codificam as ciclasas de biossíntese de giberelina CPS e KS, respectivamente (vide descrição das enzimas adiante). Já o mutante *gibberellin deficient-2* (*gib2*) é defectivo no gene que codifica a monoxigenase que converte ácido ent-7 α -hidroxikaurenóico em GA₁₂-aldeído (BENSEN; ZEEVAART, 1990).

Além dos mutantes em giberelina, mutantes em outras classes hormonais têm sido descritos em tomateiro afetando a sensibilidade e/ou metabolismo de auxina (HICKS et al., 1989; KELLY; BRADFORD, 1986; OH et al., 2006), citocininas (PINO-NUNES, 2005), ácido abscísico (TAYLOR et al., 2000; BURBIDGE et al., 1999), etileno (FUJINO et al., 1988; WILKINSON et al., 1995), brassinoesteroide (BISHOP et al., 1999;

KOKA et al., 2000; MONTROYA et al., 2002) e ácido jasmônico (HOWE et al., 1996,1999; LI et al., 2001).

2.1.1.2 Modelo Micro-Tom

As principais limitações para a utilização intensiva do tomateiro como modelo em abordagens genéticas de diversas questões fisiológicas, são seu tamanho e 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. Desse modo, a cultivar miniatura de tomateiro, criada para fins ornamentais e proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 ml de substrato, com ciclo inferior a 12 semanas (PERES, 2001). Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom (MT) pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (EMMANUEL; LEVY, 2002). Essas características permitem a geração e manutenção de grandes coleções de mutantes nessa cultivar sem que seja necessária uma infra-estrutura sofisticada ou onerosa. Além de ser portadora de alelos nulos que levam a um crescimento determinado (*selfprunning*) e ausência de ombro verde nos frutos (*uniform fruit*), pelo menos duas mutações recessivas são responsáveis pelo fenótipo anão de MT, sendo uma delas alélica à mutação *dwarf* (LIMA et al., 2004; MARTI et al., 2006). Hoje se sabe que a mutação *dwarf* é em um componente da via biossintética de brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999). Isso implica que MT possui níveis reduzidos de brassinoesteróides, embora não seja uma mutação drástica como ocorre em outros mutantes de tomateiro deficientes ou insensíveis a essa classe hormonal (KOKA et al., 2000). Apesar de não se conhecer a natureza da segunda mutação de nanismo em MT, essa cultivar não é um mutante deficiente ou insensível a GA, já que possui níveis endógenos não alterados de GA (MARTI et al., 2006) e, ao contrário dos mutantes de tomateiro nesse hormônio (KOORNNEEF et al., 1990), MT não possui alterações na germinação de sementes ou o extremo encurtamento dos entrenós. De fato, pode se obter mutantes em giberelinas e outras classes hormonais no background da

cultivar MT, a qual passa a ser considerado o controle não mutado (CARVALHO¹, em fase de elaboração). Desde que foi proposta como modelo genético, MT vem sendo usado por um crescente número de laboratórios para estudos genéticos e fisiológicos (DAVID-SCHWARTZ et al., 2001; LI et al., 2004; TIEMAN et al., 2001; ISAACSON et al., 2002; VOGG et al., 2004; WANG et al., 2005), sendo que há hoje grandes coleções de mutantes nessa cultivar, sejam esses induzidos por raio gama (MATSUKURA et al., 2007), EMS (MEISSNER et al., 1997; WATANABE et al., 2007) ou pela inserção de T-DNA (MATHEWS et al., 2003) e elementos de transposição (MEISSNER et al., 2000).

2.1.2 Principais etapas do desenvolvimento reprodutivo vegetal

O florescimento deve ser visto como um dos processos mais importantes durante o ciclo de vida das plantas superiores, sendo a passagem do estado vegetativo para reprodutivo e a garantia da perpetuação de muitas espécies vegetais. Em plantas que florescem em resposta ao comprimento do dia (fotoperiodismo), a percepção do estímulo floral (indução da floração) se dá nas folhas, sendo que é no ápice caulinar que se dá a evocação (transformação do meristema vegetativo em floral) e demais eventos do desenvolvimento que produzem cada verticilo floral. Uma série de moléculas está envolvida em cada um desses eventos. Desse modo, a percepção do fotoperíodo envolve o pigmento fitocromo e proteínas do relógio biológico (LIN, 2000). Vários genes estão envolvidos na transformação do meristema vegetativo em floral, sendo o fator de transcrição LEAFY, um dos principais (CORBESIER; COUPLAND, 2005). Durante a evocação, o meristema cessa de produzir folhas e este é convertido em um meristema de inflorescência, que é um meristema intermediário, o qual posteriormente dará origem ao meristema floral. Uma vez produzido o meristema floral, as principais moléculas responsáveis pela produção dos verticilos são os fatores de transcrição do chamado sistema ABC (BLÁZQUEZ; WEIGEL, 2000). Basicamente, os quatro tipos de verticilos

---

¹ CARVALHO, R.F.; LOMBARDI, S.P.; PINO-NUNES, L.E.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, J.E.; FORNAZIER, R. F.; PIOTTO, F.A.; PERES, L.E. (Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz"). **A collection of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) mutants useful to study the multiple hormonal control of plant development.**

(sépalas, pétalas, estames e pistilo) são produzidos pela expressão diferencial de genes regulatórios (na sua grande maioria MAD boxes) das classes A (*APETALA2*), B (*APETALA3* e *PISTILLATA*) e C (*AGAMOUS*). Além dos chamados genes ABC, existem outros componentes do sistema, o qual atualmente pode ser chamado de ABCDE (THEISSEN, 2001).

2.1.2.1 Indução floral

No modelo genético *Arabidopsis thaliana*, além do fotoperíodo, mais quatro vias (vernalização, nutrientes, autônoma e giberelinas) controlam a indução floral (BLÁZQUEZ; WEIGEL, 2000; MOURADOV et al., 2002). Essas vias agem de modo integrado, sendo que o hormônio giberelina parece possuir um papel muito importante nessa integração. Desse modo, sabe-se que GA promovem florescimento em plantas de dias longos, mesmo que essas estejam mantidas em dias curtos. Além disso, embora *Arabidopsis*, uma planta de dia longo, seja capaz de florescer em condições de dia curto, seus mutantes deficientes em GA só florescem em dia longo (WILSON et al., 1992). As giberelinas parecem estar envolvidas em todas as fases do florescimento, já que tanto a resposta ao regime de luz (KAMIYA; GARCIA-MARTINEZ, 1999) quanto à temperatura (YAMAUCHI et al., 2004) envolvem alterações na biossíntese de giberelinas. Além disso, as giberelinas atuam diretamente na floração ativando o gene *LEAFY* (gene chave envolvido na mudança da fase vegetativa para reprodutiva) (BLÁZQUEZ et al., 1997 e 1998) e interagindo com genes que regulam a formação dos verticilos florais, sobretudo os da classe B (GOMEZ et al., 1999; YU et al., 2001). Apesar do importante papel das giberelinas no florescimento de *Arabidopsis*, pouco se conhece de como essa classe hormonal seja importante para o florescimento de plantas que, ao contrário de *Arabidopsis*, não respondem ao fotoperíodo, como é o caso do tomateiro.

Em *Arabidopsis*, uma planta de dia longo, dois genes centrais controlam o florescimento. São eles o gene *CONSTANS* (*CO*) e *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). *CO* codifica uma proteína nuclear, a qual, em resposta a dias longos, induz a transcrição de *FT* que induz o florescimento (ZEEVAART, 2006).

Em tomateiro, *SFT* (*SINGLE FLOWER TRUSS*) é o ortólogo de *FT* de *Arabidopsis*, sendo um gene que regula o tempo de florescimento (do caule primário), o crescimento simpodial e a morfologia da flor (LIFSCHITZ et al., 2006). Em plantas de crescimento monopodial, uma fase vegetativa é substituída por uma fase reprodutiva, sinalizando o completo ciclo de vida da planta (LIFSCHITZ; ESHED, 2006). Porém, em tomateiro há um requerimento de uma combinação de parte vegetativa e botões florais ao longo do caule, o que gera a necessidade de uma constante regulação da transição vegetativa para a reprodutiva. Dessa forma, mutações nos genes (*SP* e *SFT*), que regulam o crescimento simpodial em tomateiro, podem mudar a arquitetura da planta. *SP* promove o crescimento indeterminado do meristema apical vegetativo e *SFT* promove sua conversão em meristema reprodutivo. Após essa conversão, o crescimento vegetativo é reassumido no meristema por uma gema situada logo abaixo da gema apical. Mais tarde, após a formação de 3 folhas, há nova conversão de meristema vegetativo em floral, reiniciando o processo. A proteína codificada por *SFT* é translocada no floema e suporta todos os dogmas do florigeno (LIFSCHITZ; ESHED, 2006).

2.1.2.2 Desenvolvimento do ovário

As comunicações entre as células e o desenvolvimento da flor são essenciais para o desenvolvimento normal do ovário. No desenvolvimento normal a decisão do pegamento é dependente do sucesso de uma completa polinização e fertilização. A fertilização após da polinização requer germinação do grão de pólen, penetração e crescimento do tubo polínico até o óvulo, para que ocorra a fusão com a célula ovo. Estímulos positivos de crescimento são produzidos pelo pólen durante a germinação e crescimento do tubo polínico, tais como os hormônios auxina e giberelinas (NITSCH, 1970). Porém, esta fusão do grão de pólen com a célula ovo resultará na formação de sementes. É o desenvolvimento do ovário, por sua vez, que dará origem ao fruto. O ovário, de estrutura em geral pouco complexa, com um ou mais carpelos, possuem epiderme externa, epiderme interna e mesofilo parenquimático onde ocorrem os feixes vasculares. O desenvolvimento do fruto, a partir do ovário, envolve atividade

meristemática, que varia com a fase de crescimento. Após a fase meristemática, o fruto se desenvolve graças a expansão ou alongamento celular, e às alterações estruturais ou funcionais das células, como espessamento, lignificação ou suberificação das paredes celulares, vacuolização e perda d'água. A Figura 1 mostra o desenvolvimento completo, a partir da polinização, até o desenvolvimento das sementes e do fruto.

Figura 1 - **A.** Esquema de uma flor, apresentando os órgãos vegetativos e reprodutivos. **B.** Antera ampliada, com os grãos de pólen. **C.** Polinização, com o grão de pólen seguindo pelo tubo polínico, até chegar ao óvulo presente dentro do ovário. Nesta figura o óvulo está ampliado mostrando em detalhes que a fusão da célula ovo pelo grão de pólen dará origem as sementes (**D**). **E.** Fruto proveniente do desenvolvimento do ovário. Modificado de Apezzato-da-Glória (2003)

2.1.2.3 Frutificação em tomateiro

Hormônios são considerados importantes mediadores no desenvolvimento do fruto após a polinização. Segundo Vriezen et al. (2008), uma mudança no balanço hormonal é um dos primeiros eventos que induzem o desenvolvimento do fruto. Atualmente, é aceito que há uma ação coordenada de sinais de crescimento que atuam sobre o pegamento do fruto e seu desenvolvimento, e que na ausência de polinização e fertilização, o ovário irá cessar a divisão celular e entrar em abscisão (GILLASPY et al., 1993; GARCÍA-MARTÍNEZ; HEDDEN, 1997). No caso do tomate, um dos frutos carnosos mais estudados, o crescimento do fruto ocorre depois do estabelecimento em duas fases consecutivas, sendo elas uma ativa fase de divisão e uma fase de expansão celular (GILLASPY et al., 1993). Durante os processos de crescimento, a parede do ovário se desenvolve formando um pericarpo composto pelo exocarpo, mesocarpo e endocarpo, enquanto que o parênquima placentário, suportado pela columela, cresce por divisão e expansão. Além disso, a partir da fecundação da célula ovo presente no óvulo, ocorre o desenvolvimento das sementes e da cavidade locular preenche com um tecido gelatinoso (HO; HEWITT, 1986; GILLASPY et al., 1993).

O estabelecimento do fruto tem sido definido como a mudança de uma condição estática do ovário da flor para um rápido crescimento do fruto jovem, permitido através da fecundação da célula ovo e desenvolvimento dos óvulos (SERRANI et al., 2007). O desenvolvimento do fruto de tomateiro pode ser dividido geralmente em quatro fases: I – desenvolvimento do ovário, fertilização e pegamento; II – divisão celular, formação de sementes e desenvolvimento precoce do embrião; III – expansão celular e maturação do embrião e IV – amadurecimento (GILLASPY et al., 1993). Durante a fase I, o pegamento do fruto (ovário) depende do sucesso da polinização e fertilização. Após a polinização, a germinação do pólen faz com que ocorra o crescimento do tubo polínico até o óvulo, localizado dentro do ovário, para que o pólen fecunde a célula ovo (localizada dentro do saco embrionário) e ocorra a formação das sementes, a partir de cada óvulo. A presença de óvulos fertilizados geralmente leva ao desenvolvimento do ovário, que posteriormente dará origem ao fruto. Como representado na Figura 2, na fase I os hormônios giberelina, auxina e citocinina estão envolvidos. Na fase II, a atividade

mitótica é alta, ocorrendo no pericarpo, nos tecidos vasculares e no desenvolvimento das sementes. Ao final da fase II, a atividade mitótica se restringe ao pericarpo, a placenta e ao desenvolvimento do embrião. O tamanho final do fruto é, em parte, resultado do número de divisões celulares que ocorreram durante o desenvolvimento após a fertilização. Na fase III, o crescimento do fruto é devido ao aumento no volume das células através da expansão. No tomate, o volume das células da placenta, tecido locular e mesocarpo podem aumentar mais que 10 vezes. Em geral, é aceito que a auxina e a giberelina são responsáveis pelo aumento na expansão celular nos tecidos do fruto. Há dois picos de acumulação de giberelina que coincidem com a ativação da fase de divisão celular no início da fase II e na fase de expansão celular (fase III). O aumento da concentração de giberelina na fase III ocorre durante a chegada ao tamanho máximo do fruto, quando os níveis de auxina diminuem (Figura 2). Tem sido sugerido que as mudanças na concentração do ácido abscísico regulam a dessecação das sementes e induzem a dormência do embrião para prevenir a germinação precoce. Na fase IV, o aumento das concentrações de etileno estão associadas com a fase de respiração dos frutos climatéricos.

Figura 2 - Fases do desenvolvimento do fruto e mudanças hormonais. Adaptado de Gillaspay et al. (1993)

Há algumas evidências que suportam a hipótese de que as giberelinas podem controlar o desenvolvimento dos frutos em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Segundo Gustafson (1959), as giberelinas estimulam a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico, além de aplicações exógenas de GA em flores de tomateiro resultarem no pegamento do fruto, mesmo na ausência de fertilização. Experimentos com aplicação de inibidores da biossíntese de GA em ovários não polinizados sugerem que o estabelecimento do fruto em tomateiro depende de GAs (FOS et al., 2000, SERRANI et al., 2007).

Há também uma intensa participação das auxinas no desenvolvimento do fruto de tomateiro. Aplicações de giberelinas em ovários não polinizados de flores de tomateiro causaram um aumento nos níveis de auxina no ovário (SASTRY; MUIR, 1963). Giberelinas produzidas pelo pólen também podem aumentar a produção de auxina no ovário, a qual irá atuar como sinal para o pegamento do fruto e posterior ativação da divisão celular. Porém a via de transdução de sinal de GA e AIA para o pegamento do fruto ainda não é clara (GILLASPY et al., 1993).

Outros hormônios também atuam no desenvolvimento do fruto. Os brassinoesteróides (BRs) aumentam o nível de licopeno, afetam o tempo de amadurecimento e a composição do fruto. O ácido Jasmônico (AJ) promove o amadurecimento por estimular a produção de etileno. As poliaminas (PA) atuam no desenvolvimento precoce do fruto e no amadurecimento (SRIVASTAVA; HANDA, 2005). Além disso, o mutante em AJ (*jai1*) possui algumas características morfológicas durante o estágio reprodutivo, como uma leve protusão do estilete e fruto diminuto comparado a MT, provavelmente por causa de sua esterilidade feminina, a qual acaba por gerar sementes pequenas e inviáveis dentro do fruto (LI et al., 2004).

2.1.2.4 Frutificação e produtividade

Os frutos, de uma maneira geral, possuem diversas formas e funções, como por exemplo, a dispersão das sementes. O valor comercial do tomate é definido pelas características de amadurecimento e qualidade dos frutos. Os processos de

amadurecimento do fruto de tomateiro diferem de *Arabidopsis* pois têm mudança de aparência, textura, sabor, aroma, e cor.

A modificação da cor ocorre devido à alteração nos níveis de clorofila e carotenóides. A cor verde dos frutos imaturos é atribuída à clorofila. No início da maturação, ocorre a degradação da clorofila, que permanece em pequena quantidade nos tecidos do fruto, além dos carotenóides. Os principais componentes dos carotenóides em tomate são o caroteno (amarelo) e o licopeno (vermelho), cuja síntese e decomposição são acentuadas na fase de transição entre a maturação e senescência do fruto. A cor vermelha dos frutos é considerada como sendo o acúmulo de licopeno.

A textura se modifica através da ação das enzimas pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG), além das mudanças através do turgor e alterações na parede celular. Há também modificação de açúcares e ácidos afetando a qualidade nutricional e o aroma, acarretando no aumento a susceptibilidade a patógenos devido à perda de integridade da parede (GIOVANNONI, 2004).

O tamanho final do fruto é em parte resultado do número de divisões celulares que ocorreu em seu desenvolvimento após a fertilização, além da fase de expansão. No crescimento e desenvolvimento do fruto há um controle metabólico dependente dos fotoassimilados (sacarose, aminoácidos e ácidos orgânicos), produzidos pelas folhas através da fixação do CO₂ e sua translocação de para as células do fruto. Essas células precisam de constante manutenção para o crescimento de ambos, fruto e embrião (GILLASPY et al., 1993).

Além disso, há relatos de que a aplicação de paclo em tomateiro também interfere na produtividade, pois segundo Berova e Zlatev (2000), a aplicação de paclo causou redução na altura e aumento na espessura do caule, acelerada formação de raiz, aumento no número de botões florais, bem como aumento na produção dos frutos sem resíduos do produto aplicado. Mediante estes resultados, decidiu-se estudar melhor a ação do hormônio giberelina no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro, fazendo-se aplicações de GA e paclo em MT.

2.1.3 Controle hormonal do desenvolvimento

O desenvolvimento das plantas é regulado pela interação de fatores ambientais e endógenos, sendo os hormônios o principal fator endógeno. Os hormônios participam de várias respostas do desenvolvimento, tais como, germinação de sementes (KUCERA et al., 2005), alongamento do caule (VANDENBUSSCHE et al., 2005), dominância apical (KEBROM et al., 2006), florescimento (OKAMURO et al., 1997) e senescência (QUILES et al., 1990). Porém, há uma complexidade nos processos de interação entre as classes hormonais, além dos fatores ambientais. Dessa forma, o uso de mutantes hormonais tem proporcionado sucesso nos estudos desses complexos fatores que controlam o desenvolvimento (KOORNNEEF et al., 1997).

2.1.3.1 Giberelinas

O termo giberelina foi usado inicialmente em 1935 para descrever uma substância produzida pelo fungo *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium sp.*) que é a causadora dos sintomas de super crescimento em arroz (DAVIES, 1995). Hoje sabe-se que as giberelinas são também produzidas pelas próprias plantas funcionando como hormônios. Mais de cento e vinte tipos de GAs têm sido identificadas em plantas superiores, fungos e bactérias, onde parece que somente um pequeno número destas são biologicamente ativas, ou seja, GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇.

2.1.3.1.1 Biossíntese

As giberelinas são substâncias terpênicas cuja formação é iniciada pela ciclagem de um precursor comum C₂₀, geranil-geranil difosfato (GGPP). Este intermediário é sintetizado nos plastídios a partir do isopentenil pirofosfato (IPP), o qual provavelmente é formado por gliceraldeído-3-fosfato e piruvato (LICHTENTHALER et al., 1997). A transformação de GGPP em um composto cíclico também é feita nos plastídios pelas enzimas ent-copalil difosfato sintase (CPS) e ent- Kaurene sintase (KS), resultando na formação do hidrocarboneto ent- Kaurene. A conversão de ent-Kaurene em GA se dá

por uma série de reações oxidativas, sendo as monoxigenases dependentes de citocromo P450, presentes no retículo endoplasmático, envolvidas na formação do intermediário GA₁₂ aldeído e as dioxigenases, presentes no citoplasma, responsáveis pela conversão desse precursor em GA₂₀. Uma das principais dioxigenases envolvidas em várias etapas da conversão de GA₁₂ aldeído em GA₂₀ é a GA20 oxidase (GA20ox). Finalmente, a enzima GA 3β-hidroxilase (GA3ox) converte GA₂₀ em GA₁ ou GA₄ e ramificações dessa via podem formar GA₃ e GA₇ (HEDDEN; PHILLIPS, 2000), que são as quatro giberelinas consideradas biologicamente ativas. A Figura 3 detalha a via de biossíntese de GA, separada espacialmente em três compartimentos celulares (plastídio, retículo endoplasmático e citosol), bem como as enzimas chave para a conversão do precursor GGPP em GÁS ativas. Também é possível visualizar os locais de atuação dos mutantes *gib* 1, 2 e 3 e seu posicionamento nos cromossomos, além do inibidor da biossíntese de GA (paclo).

Figura 3 - Esquema representando a rota de biossíntese de GA, com a localização das mutações *gib* 1, 2 e 3, bem como seu posicionamento nos cromossomos. R.E. =retículo endoplasmático, Paclo = paclobutrazol, CPS = copalil difosfato sintase, KS = ent-Kaurene sintase, KAO = ent-Kaurene ácido oxidase

Os níveis endógenos de giberelina ativa regulam sua própria síntese por ativar ou inibir a transcrição de genes para enzimas que participam da biossíntese ou inativação de giberelina. Uma das principais enzimas envolvidas na inativação de GA, e no controle de seu nível endógeno, é a GA₂ oxidase (GA2ox), a qual insere uma hidroxila na posição 2 do anel. Desse modo, todas as giberelinas com uma hidroxila (OH) na posição 2 são consideradas inativas, como mostrado na Figura 4. Da mesma forma, conforme já mencionado, o último passo da biossíntese de GA é a ação da enzima GA3ox, o que faz com que as giberelinas ativas possuam OH na posição 3 da molécula (Figura 4).

Figura 4 - Fórmula estrutural das giberelinas inativas, com a hidroxila na posição 2 (circulada em vermelho) e giberelinas ativas, com hidroxila na posição 3 (circuladas em azul)

O retardador de crescimento vegetal paclo é um triazol composto que é transportado tanto via xilema quanto floema após sua aplicação (WITCHARD, 1997). Os triazóis são conhecidos por inibirem as citocromo oxidases P450. Sendo assim, os triazóis inibem três passos enzimáticos na oxidação do ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico na via de biossíntese de GA (HEDDEN; GRAEBE, 1985), onde as P450 atuam como co-fatores, inibindo então a biossíntese de GA (Figura 5). Efeitos morfológicos e anatômicos dos triazóis incluem redução no alongamento do caule e do

comprimento do tricoma, o reforço de cloroplastos e aumento do crescimento da raiz. Paclo é atualmente registrado (Cultar, ICI Américas, Goldsboro, NC) para utilização em plantas cultivadas, tais como maçãs, pêssegos e citrus, e tem sido efetivo no controle do crescimento de muitas outras culturas, podendo oferecer uma alternativa para o uso em produção vegetal (DAVIS; CURRY, 1991). Além de paclo existem outros inibidores da biossíntese de GA, como representado na Figura 5.

Figura 5 - Local de atuação do inibidor da biossíntese de GA, paclo, na via de biossíntese de GA, além de outros inibidores. Modificado de Redemacher (2000)

2.1.3.1.2 Transdução de sinais de GA

Via de transdução de sinal de GAs ainda não foi totalmente desvendada, embora considerável progresso tenha ocorrido nos últimos anos, sobretudo recentemente com o isolamento do gene *GID-1* em arroz, o qual codifica para uma proteína solúvel receptora de GA (UEGUCHI-TANAKA et al., 2005). Após a ligação com o receptor, a ação do GA envolve basicamente a desrepressão de fatores de transcrição do tipo GAMyB

(RICHARDS et al., 2001) que estão reprimidos pelas chamadas proteínas DELLA (ALVEY; HARBERD, 2005), regulador chave para sinalização de GA (UEGUCHI-TANAKA, 2007). A desrepressão se dá pela degradação das proteínas DELLA no sistema proteossômico 26S, como mostra a Figura 6.

Figura 6 - Desrepressão da proteína DELLA na presença de GA. Adaptado de Alvey e Harberd (2005)

Para que as proteínas DELLA sejam reconhecidas pelo complexo proteossômico, elas necessitam primeiro interagirem com proteínas do tipo F-box denominadas SLEEPY (SLY) e SNEEPY (SNE) (DILL et al., 2004). De modo contrário a SLY e SNE, a proteína SPINDLY (SPY) parece promover a ação repressora das proteínas DELLA (Figura 7A). Uma vez desreprimido, os fatores de transcrição GAMBYB são capazes de promover a transcrição de vários genes os quais são alvos primários de GA (OLSZEWSKI et al., 2002), como, por exemplo, o gene que codifica para α -amilase e o gene indutor de floração *LEAFY*, bem como outros genes necessários para os processos de crescimento regulados por GA como a xiloglucano endotransglicosilase (XET).

2.1.3.1.3 Impacto de GA no desenvolvimento

As giberelinas endógenas biologicamente ativas influenciam uma grande variedade de processos do desenvolvimento, tais como germinação (GROOT et al., 1988); alongamento de entrenós (DAVIES, 1995); arquitetura foliar (GRAY, 1957; ROSIN et al., 2003), formação de frutos (RAPPAPORT, 1957; GUSTAFSON, 1959; SAWHNEY; GREYSON, 1971; GROOT et al., 1987; FOS et al., 2000) e indução de floração, sobretudo em plantas de dia longo (WILSON et al., 1992). Ao contrário de *Arabidopsis*, o tempo de florescimento de tomateiro não é controlado pelo fotoperíodo (ATHERTON; HARRIS 1986). O controle do florescimento é realizado principalmente por uma via autônoma que interage com o desenvolvimento da planta. No entanto, a despeito de muitos trabalhos envolvendo tratamentos exógenos de giberelina em diferentes espécies vegetais como, por exemplo, milho (BALUSKA et al., 1993), arroz (IKEDA et al., 2001), pinus (MacDONALD et al., 2006), batata (ALEXOPOULOS et al., 2007), *Arabidopsis* (LI et al., 2007) e tomateiro (FOS et al., 2000; SERRANI et al., 2007; SRIVASTAVA; HANDA, 2005; VRIEZEN et al., 2008), praticamente inexistem evidências genéticas e moleculares de que as giberelinas estejam envolvidas no florescimento de plantas de dia neutro como o tomateiro.

2.1.3.1.4 Desenvolvimento reprodutivo de mutantes de GA em tomateiro

A via de florescimento dependente de giberelina em tomateiro é essencial para formação de flores férteis, já que alguns mutantes deficientes de GA não florescem (KOORNNEEF et al., 1990). Estudos com o mutante deficiente em GA *gib1* tem mostrado um desenvolvimento floral incompleto, no entanto, a simples aplicação de GA no início do desenvolvimento restabelece a fertilidade indicando que GA é essencial para o desenvolvimento floral de tomateiro (GROOT et al., 1987). Outros experimentos onde foram aplicados inibidores de GA demonstraram que este hormônio é necessário para o início do desenvolvimento floral (PHARIS; KING, 1985). A aplicação de GA estimulou crescimento, florescimento e pegamento do fruto, porém induziu

partenocarpia em tomateiro (RAPPAPORT, 1957; GILLASPY, et al., 1993; VRIEZEN et al., 2008).

O gene *LeGAI*, que codifica uma proteína DELLA, foi isolado em tomateiro (BASSEL et al., 2004). Essas proteínas possuem um domínio chamado VHVID, o qual é bastante conservado sendo presente em proteínas da família GRAS que incluem as proteínas DELLA (BASSEL et al., 2008). Há evidências de que o mutante *procera* seja uma mutação DELLA (*LeGAI*) em tomateiro (BASSEL et al., 2008). A primeira evidência se refere ao fato de que o fenótipo do mutante *pro*, de resposta constitutiva a GA, é praticamente não afetado pela aplicação de paclo, um inibidor da biossíntese, mas não da ação de GA. A segunda evidência é a de que há uma mudança em um domínio conservado (VHVID) no mutante *pro*. Desse modo, a maioria dos genótipos analisados (LA3283 cv. Alisa Craig, LA0565 cv. Condine Red, LA 0803 e LA 0730), os quais são portadores de alelos da mutação *pro*, apresentaram uma mutação pontual resultando em mudança de valina para glutamato (VHVID para VHEID), sendo que esse resíduo em outras proteínas DELLA, como GAI, RGA, RGL2, SLN1 e SLR1 de arroz, é conservado (Figura 7B). Além disso, o domínio VHVID é requerido para reprimir respostas de GA.

Figura 7 - **A.** Atuação de GA sobre a proteína DELLA. **B.** Alinhamento parcial de aminoácidos da proteína DELLA, sendo *LeGAI* e *pro* de tomateiro, GAI e RGL2 de *Arabidopsis*, SLN1 de trigo e SLR1 de arroz. A proteína *LeGAI* para o mutante *procera* de tomate carrega uma mutação valina para glutamato em um domínio conservado em outras DELLA. Adaptado de Bassel et al. (2008)

A identidade de *pro* com uma proteína DELLA está de acordo com resultados prévios obtidos nesse mutante. Em seus experimentos, Van Tuinen et al. (1999),

observaram que tratamentos de *pro* com paclo diminuíram a altura das plantas em somente 22% e que *pro* tem níveis de GA reduzidos comparados ao tipo selvagem, sendo hipersensível e não superprodutor. Além disso, embora a aplicação de GA em *pro* aumente o crescimento do caule, a aplicação de GA promove um alongamento ainda maior em plantas do tipo selvagem comparadas a *pro* (JUPE et al., 1998).

Em resultados próprios, nós observamos que em *pro*, a aplicação de paclo resultou numa pequena redução na altura das plantas, quando comparadas ao controle MT com aplicação de paclo, onde a redução foi bem maior (dados não publicados).

2.2 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi estudar o envolvimento da giberelina na regulação do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv Micro-Tom. Para tanto, as seguintes metas foram propostas:

- I) Estudar de modo comparativo o padrão do florescimento dos genótipos *gib3*, *procera* e Micro-Tom (MT).
- II) Avaliar a ação de um inibidor da biossíntese de GA (paclobutrazol) em diferentes fases do desenvolvimento de MT.
- III) Testar o efeito da aplicação de GA, em diferentes fases do desenvolvimento de MT.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) contendo as mutações *procera* (*pro*), *gibberellin deficient 3* (*gib3*) (Tabela 2) e a cultivar Micro-tom (MT). O parental MT foi gentilmente fornecido pelo Dr. A. Levy (Weizmann Institute of Science – Israel). Em trabalhos prévios no Laboratório de Controle Hormonal do

Desenvolvimento Vegetal os mutantes *gib3* e *pro* foram transferidos através de retrocruzamento sucessivos (introgressão), para a cultivar MT (CARVALHO, 2007).

Tabela 2 - Mutante de tomateiro com alterações hormonais

Mutantes	Classe hormonal ^a	Efeito / Função Gênica	Origem / Referência
<i>gibberellin deficient 3 (gib3)</i>	GA	Deficiência em GA. Plantas anãs, coloração verde-escuro das folhas. Defectivo para <i>ent</i> -kaurene sintase (KS).	LA2895 ^b cv Moneymaker
<i>procera (pro)</i>	GA	Aumento na sensibilidade. Folhas com borda contínua, caule bastante alongado. Mutação em uma proteína DELLA.	LA0565 ^c cv Condine Red

^a GA = giberelina; ^b Bensen e Zeevaart (1990); ^c Jones (1987) e Bassel et al. (2008)

2.3.2 Cultivo em casa de vegetação

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, que possui sistema automático de irrigação (4 vezes ao dia) e temperatura média anual de 28° C. A semeadura foi feita em bandeja contendo uma mistura, previamente umedecida, de substrato comercial (Plantmax HT) e vermiculita expandida na proporção de 1:1, suplementado com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Após 10, dias as plântulas foram transferidas para vasos de 150 mL e colocadas em canaletas, acrescentando-se uma colher de café de NPK e de calcário em cada vaso. Inicialmente foram realizados diversos cultivos em casa de vegetação, a fim de multiplicar as sementes de *gib3* e obter um número desejado, para possibilitar o início dos experimentos comparativos. Como *gib3* é defectivo na biossíntese de GA, as sementes foram previamente germinadas em gerbox contendo solução de GA 100 µM.

2.3.3 Coleta e processamento das sementes

As sementes foram coletadas de frutos maduros, juntamente com a polpa e foram mantidas durante dois dias sob fermentação com água e uma colher de café de fermento biológico (Fermix), para facilitar a retirada da mucilagem que fica ao redor da semente, o que dificulta sua posterior germinação. Após dois dias, as sementes foram lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira plástica, espalhadas sobre papel sulfite, sendo deixadas para secar em ambiente ventilado e sombreado, durante dois dias. As sementes foram retiradas do papel e colocadas em envelopes de papel alumínio, sendo armazenadas em caixas plásticas contendo sílica, sob refrigeração (7 a 14° C).

2.3.4 Efeito de giberelina (GA) no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro

Inicialmente foram utilizados os mutantes *gib3* e *pro*, além da cultivar miniatura de tomateiro MT como controle. Sementes dos três genótipos foram semeadas em bandeja em casa de vegetação e no estágio de plântula foram transferidas para vasos individuais, sendo um total de 3 tratamentos (cada tratamento representado por um genótipo) com 20 plantas (repetições) por tratamento. Foram feitas avaliações de dias para antese e altura na antese. Outras avaliações como número de entrenós na antese, número de flores por inflorescência, número de frutos e peso total, não puderam ser realizadas, pois o mutante *gib3*, sem aplicação de GA, não saiu de seu estado vegetativo.

2.3.5 Aplicação de paclobutrazol (paclo) em diferentes estágios do desenvolvimento

Visando avaliar o efeito de paclo, inibidor da biossíntese de GA, no crescimento vegetativo, indução floral e frutificação de tomateiro, foram feitas aplicações de solução

de paclo 100 μ M, acrescidas de 1% de espalhante adesivo, em diferentes estágios do desenvolvimento de MT.

Aproximadamente 200 sementes de MT foram germinadas em bandeja em casa de vegetação. Na época do transplante foram separadas em 7 lotes com 20 plantas cada. O primeiro lote não teve aplicação do inibidor da biossíntese de GA e recebeu o nome de “Sem paclo”. O segundo lote teve aplicação no quatro dias após a semeadura, nomeado “4d Paclo”. O terceiro lote teve aplicação oito dias após semeadura. O quarto lote doze dias após semeadura. O quinto lote teve aplicação aos dezesseis dias após semeadura. O sexto lote teve aplicação aos vinte dias após a semeadura e o sétimo e último lote teve cinco aplicações de paclo em todos os períodos acima descritos, recebendo o nome de “5X paclo”. Cada aplicação consistiu na pulverização da planta inteira até o ponto de escorrimento. Para cada um dos lotes foram feitas avaliações de tempo para 50% das plantas apresentarem botões florais visíveis a olho nu ($n = 20$ plantas), tempo para a antese das plantas ($n = 20$ plantas), altura ($n = 20$ plantas) e número de entrenós na antese ($n = 20$ plantas), número de frutos por planta no final do ciclo ($n = 20$ plantas), peso total de frutos por planta ($n = 20$ plantas). Para medições dos frutos, foram colhidos frutos de plantas individualmente no final do ciclo, contados e pesados, e após isto, foram agrupados todos os frutos de um mesmo lote para medição da frequência de frutos por categorias de maturação (maduros, de vez e verdes) e classe de tamanho. As classes de tamanho foram nomeadas: A, frutos com peso superior a 6 g; B, frutos de 4 a 6 g; C, frutos de 2,5 a 3,9 g e D, frutos menores que 2,5g.

2.3.6 Aplicação de GA em diferentes estágios de desenvolvimento

Visando avaliar o efeito da aplicação de GA no crescimento vegetativo, indução floral e frutificação de tomateiro, foram feitas aplicações de GA 100 μ M em diferentes estágios do desenvolvimento de MT.

Um experimento com 7 tratamentos foi conduzido em casa de vegetação (7 lotes com 10 plantas cada), utilizando a cultivar MT. Assim como descritas para paclo (item anterior) foram feitas uma aplicação de GA 100 μ M em cada lote aos 8, 16, 24, 32 e 40 dias após semeadura (planta inteira até o ponto de escorrimento), computados após a

semeadura, um tratamento com aplicações em todos dias acima descritos, além de um tratamento controle sem aplicação. Para cada um dos lotes foram feitas avaliações de tempo para 50% das plantas apresentarem botões florais visíveis a olho nu ($n = 10$ plantas), tempo para a antese das plantas ($n = 10$ plantas), altura ($n = 10$ plantas) e número de entrenós na antese ($n = 10$ plantas), número de frutos por planta no final do ciclo ($n = 10$ plantas), peso total de frutos por planta ($n = 10$). Para medições dos frutos, foram colhidos frutos de plantas individualmente, contados e pesados, e após isto, foram agrupados todos os frutos de um mesmo lote para medição da frequência de frutos por categorias de maturação (maduros, de vez e verdes) e classe de tamanho. As classes de tamanho foram: A, com peso superior a 6 g; B, com frutos de 4 a 6 g; C, com frutos de 2,5 a 3,9 g e D, com frutos menores que 2,5 g. Além disso, foram também feitas análises do brix (Sólidos Solúveis Totais) através de um refratômetro digital (Atago PR-101), sendo avaliado em 10 repetições para cada tratamento, utilizando um fruto por planta.

2.3.7 Análise comparativa dos efeitos da aplicação de GA e paclo

Após análise dos dados dos experimentos anteriores, o melhor resultado de cada experimento foi simultaneamente repetido. Aproximadamente 100 sementes de MT foram germinadas e na época do transplante foram separadas em três lotes com 24 plantas cada. Um dos lotes teve aplicação de paclo aos 16 dias após a semeadura, outro lote teve aplicação de GA aos 16 dias após a semeadura e o terceiro lote foi mantido como controle sem aplicação. Além de todos os parâmetros avaliados nos itens anteriores, a primeira e segunda inflorescência foram utilizadas para a contagem do número de flores por inflorescência.

2.4 Resultados

2.4.1 Efeito da giberelina no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro

Para se determinar o impacto da giberelina (GA) no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro foram utilizados os mutantes *gib3* (deficiente na biossíntese de GA) e *procera* (*pro* supersensível a GA). Ambos mutantes apresentaram atraso no florescimento representado por tempo médio em dias para antese (Figura 8A), quando comparados ao controle Micro-Tom (MT), porém não houve diferença significativa para *pro*. Pode-se observar que *gib3*, sem aplicação do hormônio GA, apresenta um atraso significativo tanto no crescimento vegetativo quanto no crescimento reprodutivo (Figura 8C), além de possuir um encurtamento dos entrenós (Figura 8B e C). Esta característica de *gib3* se deve ao fato de GA ser um hormônio importante na indução floral (KOORNNEEF et al., 1990), o que impossibilita seu completo desenvolvimento na ausência de aplicação exógena desse hormônio. O mutante *pro* também possui atraso na antese, ainda que menor que no mutante *gib3* (Figura 8A), porém neste caso o atraso é provavelmente devido ao fato de *pro* possuir um crescimento vegetativo mais pronunciado (VAN TUINEN et al., 1999), o que pode ser evidenciado pela maior altura na antese (Figura 8B e C). Esse crescimento vegetativo provavelmente influencia negativamente o crescimento reprodutivo (Figura 9).

Figura 8 - Caracterização dos mutantes *gib3* e *procera* (*pro*) comparado ao modelo Micro-Tom (MT). **A.** Dias para antese. **B.** Altura na antese. **C.** Plantas com 38 dias. Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

Esses resultados sugerem que em tomateiro GA pode ao mesmo tempo adiantar e atrasar o florescimento. Uma explicação para isso pode ser o fato de GA ter um papel direto na indução floral, mas afetá-lo negativamente de modo indireto, através da promoção do crescimento vegetativo. Como em tomateiro o florescimento não está associado a um alongamento do caule (bolting), pode se dizer que o crescimento vegetativo nessa espécie é em geral em detrimento do reprodutivo (Figura 9).

Figura 9 - Esquema representativo da hipótese de que GA ativa diretamente o florescimento e também o crescimento vegetativo, sendo que esse último é uma maneira de GA também inibir indiretamente o florescimento. O mutante *procera* atua induzindo a via do crescimento vegetativo devido a supersensibilidade a GA. Paclo pode inibir o florescimento atuando na via direta de GA, tornando-se similar a mutantes deficientes na biossíntese de GA (gib3)

Diante dos resultados apresentados pudemos concluir que nos mutantes, o crescimento vegetativo e reprodutivo ocorrem de maneira interligada, dificultando seu entendimento. Com a intenção de se separar essas duas vias do desenvolvimento, uma alternativa foi desenvolvida, com aplicações de paclobutrazol (paclo), inibidor da biossíntese de GA, e de GA₃ em momentos específicos do ciclo de vida da planta.

2.4.2 Efeito da aplicação de paclobutrazol no crescimento e frutificação de tomateiro

2.4.2.1 Crescimento vegetativo e indução floral

Para verificar o impacto de GA no crescimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro, na tentativa de separar esses dois eventos, foram realizadas medições em plantas de MT tratadas com um inibidor da biossíntese desse hormônio (paclobutrazol

100 μ M) em diferentes estágios do desenvolvimento (lotes aos 4, 8, 12, 16, 20 dias após a semeadura e um lote em todos os períodos) bem como medições no mutante *pro*, supersensível a GA e quase isogênico a MT como controle. Paclo é um triazol composto que é transportado tanto via xilema quanto floema após sua aplicação (WITCHARD, 1997). Essa substância inibe especificamente três passos enzimáticos na oxidação do ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico na via de biossíntese de GA (HEDDEN; GRAEBE, 1985). Pode-se observar que o tratamento com paclo em qualquer estágio do desenvolvimento provocou uma redução na altura das plantas, sendo essa redução mais acentuada, obviamente, quando aplicado em 5 períodos num mesmo tratamento (paclo 5X) e menos efetivo se aplicado uma única vez aos 8 dias após semeadura (Figura 10A e B). O mutante *pro* apresentou um crescimento acentuado, sendo quase duas vezes mais alto que MT aos 48 dias de idade.

O tratamento paclo 5X também levou a um atraso no desenvolvimento reprodutivo caracterizado por um maior tempo requerido para formação de seus botões florais (37 dias após a semeadura, Figura 11A), e para antese (47 dias após semeadura, Figura 11B). Aplicações de paclo uma única vez no ciclo tendeu a adiantar a antese, com exceção da aplicação aos 8d, onde essa antecipação não foi significativa (Figura 11B). O mutante *pro* não diferiu significativamente de MT controle (Sem Paclo) tanto no tempo requerido para formação de botões florais visíveis, quanto para antese das plantas. Porém, *pro* teve um adiantamento no aparecimento dos botões, mas atrasou em sua abertura (Figura 11A e B). Tratamentos com paclo no início do ciclo (4, 8 e 12 d) ou nos cinco períodos (paclo 5X) tenderam a diminuir o número de entrenós na antese (Figura 11C). De modo contrário, as plantas com aplicação de paclo aos 16 e 20d, possuíram número de entrenós iguais ao controle (Figura 11C), embora com caules mais curtos (Figura 10B). Para os tratamentos de aplicação de paclo aos 4 e 12 d, a diminuição no número de entrenós coincidiu com uma diminuição no tempo de antese. Porém, nos demais tratamentos, não houve correlação entre esse dois parâmetros. No caso de paclo 5X, a deficiência de GA parece ter tanto atrasado a antese, quanto reduzido o número de entrenós requeridos para ela, o que sugere que o baixo nível de GA tanto diminui o crescimento vegetativo diminuindo o número de entrenós, quanto atrasa a indução floral. De modo contrário, o excesso de resposta a GA no mutante *pro*

aumentou o número de entrenós na antese (Figura 11C), embora não tenha provocado atraso significativo no tempo requerido para ela (Figura 11B).

Embora GA seja um promotor do florescimento em plantas com resposta a fotoperíodo, sobretudo naquelas de dia longo (e. g. *Arabidopsis*) (BLÁZQUEZ; WEIGEL, 2000), nossos resultados não deixam claro essa dependência em tomateiro, uma planta de florescimento não dependente de fotoperíodo (MIZOGUCHI et al., 2007). Em *Arabidopsis*, uma planta de dia longo, o florescimento envolve um alongamento acentuado do caule (“bolting” ou escapo floral), sendo esses dois eventos promovidos por GA (BLÁZQUEZ; WEIGEL, 2000). Em tomateiro, nossos resultados evidenciam que tanto a diminuição do nível endógeno de GA (paclo 5X) quanto uma maior resposta a esse hormônio (mutante *pro*) tenderam a atrasar o florescimento. No caso de paclo 5X há uma diminuição concomitante do crescimento vegetativo e reprodutivo, mas no mutante *pro* o atraso no florescimento é provavelmente devido a um aumento no próprio crescimento vegetativo. Por outro lado, tratamentos com paclo em períodos determinados do ciclo tenderam a promover um nanismo menos acentuado e adiantamento da antese (Figura 11B – 16d).

Pode-se concluir que paclo, se aplicado em uma determinada fase do desenvolvimento, caracterizado aos 16 dias após a semeadura, parece levar a uma redução na altura, sem atrasar o desenvolvimento reprodutivo.

Figura 10 - Interação entre o estágio do desenvolvimento e a resposta ao tratamento exógeno de paclobutrazol (paclo) 100 μ M, inibidor da biossíntese de GA, no crescimento vegetativo (altura) de Micro-Tom (MT). **A.** Foto de plantas com 48 dias do mutante *procera* (*pro*), comparado ao isogênico MT, tratados com paclo aos 4 dias (Paclo 4d), 8 dias (Paclo 8d), 12 dias (Paclo 12d), 16 dias (Paclo 16d) e 20 dias (Paclo 20d) após a semeadura, bem como aplicações em todos os períodos referidos (Paclo 5X). **B.** Altura média das plantas na antese ($n=20$ plantas). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p=0.05$)

Figura 11 - Interação entre o estágio do desenvolvimento e a resposta ao tratamento exógeno de paclobutrazol (paclo) 100 μ M, na indução floral de Micro-Tom (MT). **A.** Tempo em dias para aparecimento de botões florais visíveis a olho nu de 50% das plantas do mutante procera (*pro*), comparado ao isogênico MT, tratados com paclo aos 4 dias (Paclo 4d), 8 dias (Paclo 8d), 12 dias (Paclo 12d), 16 dias (Paclo 16d) e 20 dias (Paclo 20d) após a semeadura, bem como aplicações em todos os períodos referidos (Paclo 5X) ($n = 20$ plantas). **B.** Tempo em dias para a antese (abertura dos botões florais) em cada planta ($n = 20$ plantas). **C.** Número médio de entrenós na antese ($n = 20$ plantas). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

2.4.2.2 Frutificação

Quanto à frutificação, a aplicação de paclo provocou uma redução significativa na massa dos frutos por planta somente no tratamento paclo 5X (Figura 12A), sendo que os demais tratamentos apresentaram ou um aumento da massa de seus frutos ou se mantiveram estáveis quando comparados ao controle. Tratamentos com paclo aos 4d e 12d tiveram uma massa de frutos por planta aumentada, provavelmente devido ao maior número de frutos nesses tratamentos (Figura 12A e B). Já nos tratamentos paclo 16d e 20d, o aumento na massa de frutos não foi acompanhado por um aumento no número dos mesmos (Figura 12A e B), sugerindo que esses tratamentos formaram frutos mais graúdos. Esses resultados puderam ser confirmados devido a maior frequência de frutos tipo A (maiores que 6g) nesses tratamentos (Figura 12C). Os resultados sugerem que paclo, ao ser aplicado aos 16 ou 20 dias, onde a planta já se encontra estabelecida, atua somente na redução do crescimento vegetativo (Figura 10A), direcionando a maior parte dos fotoassimilados para o crescimento de seus frutos.

A taxa de amadurecimento foi também avaliada dividindo-se os frutos em três classes, maduros, de vez e verdes, na época em que os frutos de todos os tratamentos foram coletados. Pode-se observar que o atraso no desenvolvimento vegetativo provocado por paclo 5X pode ter refletido em uma maior frequência de frutos ainda verdes nesse tratamento (Figura 12D). A aplicação de paclo em estágios iniciais do desenvolvimento (4, 8 e 12d) também pode ter atrasado o amadurecimento, evidenciado por uma maior frequência de frutos verdes (Figura 12D). Para os melhores tratamentos com relação à frutificação acima descritos (16 e 20d), nota-se que o tratamento 20d é inferior ao 16d apresentando mais frutos verdes e menos frutos maduros. Como na maioria desses tratamentos não houve atraso significativo no tempo da antese (Figura 11B), há uma indicação de que a aplicação do inibidor da biossíntese de GA pode atrasar o amadurecimento dos frutos. Porém este fato não é mais observado no tratamento 16d, provavelmente devido ao efeito compensatório de um adiantamento no tempo para antese nesse tratamento (Figura 11B). Dessa forma, mesmo GA sendo essencial para o amadurecimento dos frutos, a aplicação de paclo em um determinado momento, 16 dias após a semeadura, levou a uma maior produtividade provavelmente

em virtude de uma redução na altura da planta (Figura 10B), direcionando maior parte dos fotoassimilados para a frutificação. Além disso, observou-se um adiantamento na antese (Figura 11B), maior massa de frutos (Figura 12A), embora com número de frutos pouco menor que MT (Figura 12B) provavelmente devido ao fato de apresentar uma maior porcentagem de frutos de classes A e B nesse tratamento (Figura 12C), além de uma taxa de amadurecimento maior (Figura 12D).

Esses resultados podem ser confirmados pela aplicação de paclo 5 períodos em um mesmo tratamento (paclo 5X), onde se pode observar que a classe de frutos tipo A diminui drasticamente (Figura 12C) comparada tanto ao controle como a paclo 16d, além de um efeito prejudicial também no amadurecimento (Figura 12D).

Figura 12 - Interação entre o estágio do desenvolvimento e a resposta ao tratamento exógeno de paclobutrazol (paclo) 100 µM, na frutificação de Micro-Tom (MT). Os tratamentos com paclo foram aos 4 dias (Paclo 4d), 8 dias (Paclo 8d), 12 dias (Paclo 12d), 16 dias (Paclo 16d) e 20 dias (Paclo 20d) após a semeadura, bem como aplicações em todos os períodos referidos (Paclo 5X). **A.** Peso dos frutos por planta de cada tratamento (n = 20 plantas). **B.** Número de frutos por planta em cada tratamento (n = 20 plantas). **C.** Frequência de frutos colhidos de 20 plantas aos 95 dias e separadas por categoria de tamanho de fruto (peso). **D.** Frequência de frutos colhidos de 20 plantas aos 95 dias e separadas por categoria de amadurecimento dos frutos. Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. (p = 0.05)

2.4.3 Efeito da aplicação de giberelina no crescimento e frutificação de tomateiro

2.4.3.1 Crescimento vegetativo e indução floral

Para avaliar o efeito de GA no crescimento vegetativo e na indução floral de tomateiro, foram feitas aplicações de GA 100 μ M em diferentes fases do desenvolvimento de MT (tratamentos aos 8, 16, 24, 32, 40 e um lote com aplicação em todos os períodos). Como é conhecido que GA atua no aumento do brix e que brix é inversamente proporcional à produtividade, seria importante obter um aumento do brix sem diminuir a produtividade. Portanto esta medida foi avaliada ao final do ciclo das plantas de cada tratamento.

As Figuras 13 A e B representam plantas de MT com 47 dias, onde todas as aplicações de GA já haviam sido efetuadas, visto que o último lote recebeu aplicação 40 dias após a semeadura, representado pela planta 40D. Pode-se observar uma altura na antese mais pronunciada, quando aplicado GA em 5 períodos (GA 5X) e uma tendência a menor altura se aplicado aos 8d (Figura 13B). O tratamento 16d foi o que mais se aproximou do controle com relação à altura na antese. Este mesmo tratamento apresentou um adiantamento tanto na formação de botões florais quanto na antese (Figura 14A e B), sendo exatamente o contrário do resultado apresentado para aplicação de paclo, evidenciando que GA pode atuar como um promotor do florescimento de tomateiro.

Figura 13 - Resposta ao tratamento exógeno de GA 100 μ M, no crescimento vegetativo (altura) de Micro-Tom, aplicados aos 8 dias após semeadura (GA 8d); 16 dias (GA 16d); 24 dias (GA 24d); 32 dias (GA 32d); 40 dias (GA 40d); 5 aplicações em todos os períodos referidos (GA 5X) e controle sem aplicação (Sem GA). **A.** Foto de plantas de Micro-Tom (MT) tratadas com GA aos 48 dias **B.** Altura média das plantas na antese ($n = 10$ plantas). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

Figura 14 - Interação entre o estágio do desenvolvimento e a resposta ao tratamento exógeno de GA 100 μ M, na indução floral de Micro-Tom (MT). **A.** Tempo em dias para aparecimento de botões florais visíveis a olho nu de 50% das plantas tratados com GA aos 4 dias (GA 4d), 8 dias (GA 8d), 12 dias (GA 12d), 16 dias (GA 16d) e 20 dias (GA 20d) após a semeadura, bem como aplicações em todos os períodos referidos (GA 5X) ($n = 10$ plantas). **B.** Tempo em dias para a antese (abertura dos botões florais) em cada planta ($n = 10$ plantas). **C.** Número médio de entrenós na antese ($n = 10$ plantas). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

2.4.3.2 Frutificação

O tratamento GA 5X, apesar de possuir um adiantamento na antese, embora não significativo, comparado ao controle (Figura 14B) e um aumento no comprimento do caule (Figura 13B), teve uma diminuição na produtividade (Figura 15A). Já o tratamento aos 16d não teve alteração na produtividade, sendo equivalente ao controle (Figura 15A e B), quanto ao peso total dos frutos e número de frutos por planta. Com relação à qualidade do fruto, o melhor tratamento parece ter sido a aplicação de GA aos 16 dias após a semeadura, caracterizado por uma menor formação de frutos pequenos ($< 2,5g$) (Figura 15A), além de se manter parcialmente igualado a MT com relação a frutos de classe A e B (Figura 15C).

A taxa de amadurecimento dos frutos teve uma pequena variação entre os tratamentos, tendendo a um aumento na taxa de frutos maduros e uma diminuição de frutos verdes no tratamento 16d (Figura 15D).

Levando em consideração que produtividade e brix são normalmente inversamente proporcionais em tomateiro, o tratamento GA 16d mostra-se mais eficiente por apresentar brix elevado (Figura 16), sem afetar negativamente a massa de frutos (Figura 15A), frequência de frutos tipo A e B (Figura 15C) e taxa de amadurecimento (Figura 15D). O tratamento com 5 aplicações de GA (GA 5X), apesar de seu brix elevado, possuiu todos os outros parâmetros de produtividade baixos, mostrando que a atuação de GA seja provavelmente pontual.

Figura 15 - Interação entre o estágio do desenvolvimento e a resposta ao tratamento exógeno de GA 100 μ M, na frutificação de Micro-Tom (MT). Os tratamentos com aplicação de GA foram aos 4 dias (GA 4d), 8 dias (GA 8d), 12 dias (GA 12d), 16 dias (GA 16d) e 20 dias (GA 20d) após a semeadura, bem como aplicações em todos os períodos referidos (GA 5X). **A.** Peso dos frutos por planta de cada tratamento (n = 10 plantas). **B.** Número de frutos por planta em cada tratamento (n = 10 plantas). **C.** Frequência de frutos colhidos de 10 plantas aos 95 dias e separadas por categoria de tamanho de fruto (peso). **D.** Frequência de frutos colhidos de 10 plantas aos 95 dias e separadas por categoria de amadurecimento dos frutos. Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. (p = 0.05)

Figura 16 - Medida da porcentagem do brix (sólidos solúveis totais) de plantas de MT, no final do ciclo, em diferentes tratamentos (n = 10 frutos de cada tratamento). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. (p = 0.05)

2.4.4 Comparação dos efeitos da aplicação de paclo e GA no crescimento e frutificação de tomateiro

2.4.4.1 Crescimento vegetativo e indução floral

Para confirmação e reprodução dos dados obtidos, foram selecionados os melhores resultados de cada experimento previamente analisado, e conduzido um experimento de comparação dos efeitos da aplicação de paclo e GA no crescimento e frutificação de MT.

Plantas de MT foram submetidas a tratamento de GA 100 μ M aos 16 dias após a semeadura (GA 16D) e paclo 100 μ M aos 16 dias após a semeadura (Paclo 16D). As Figuras 17 A e B representam o efeito de GA no alongamento dos entrenós, ressaltando a altura na antese de plantas aos 48 dias, sendo as plantas com aplicação de GA mais altas, e com aplicação de paclo mais baixas que o controle na antese. Apesar da

diferença na altura dos três tratamentos, não houve diferença no número de entrenós entre eles (Figura 18B), confirmando o efeito de GA somente no alongamento dos entrenós e confirmando os resultados obtidos nos experimentos anteriores. Além disso, tanto aplicação de GA quanto de paclo, anteciparam a antese, porém com diferença significativa somente para aplicação de GA (Figura 18A), repetindo-se os resultados anteriores.

Figura 17 - Tratamentos com aplicação de giberelina 100 μ M aos 16 dias após a semeadura (GA 16D), e paclo 100 μ M aos 16 dias (Paclo 16D) A. Foto de plantas de MT aos 48 dias, da esquerda para a direita, Controle, GA 16D e Paclo 16D. B. Altura média das plantas na antese ($n = 24$ plantas). Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

Figura 18 - Tratamentos com aplicação de giberelina 100 μ M aos 16 dias após a semeadura (GA 16D), e paclobutrazol 100 μ M aos 16 dias (Paclo 16D) **A.** Tempo em dias para antese (abertura dos botões florais) das plantas tratadas com GA e paclo aos 16 dias após a semeadura (n = 24 plantas). **B.** Número médio de entrenós na antese (n = 24 plantas). **C.** Número de flores por inflorescência, das duas primeiras inflorescências de cada planta. Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. ($p = 0.05$)

Outro dado avaliado neste experimento foi o número de flores por inflorescência. A primeira inflorescência formada parece possuir um número maior de flores que a segunda em todos os tratamentos observados (Figura 18 C). Com relação aos tratamentos, somente a aplicação de GA diminuiu significativamente o número de flores da primeira inflorescência, sendo esse mesmo efeito não significativo na segunda inflorescência.

2.4.4.2 Frutificação

Tanto para peso de frutos (Figura 19A) quanto para número de frutos (Figura 19B), não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, confirmando com os dados dos experimentos previamente realizados.

Com relação à frequência dos frutos separados por classe de peso (Figura 19C), tanto o tratamento GA 16D quanto paclo 16D mostraram-se mais vantajosos que o controle quando analisados os frutos das classes A e B, repetindo-se os resultados anteriores. O mesmo pode-se dizer com relação ao brix, onde os dois tratamentos tiveram brix maior que o controle, sendo a aplicação de GA significativamente mais alta e um pouco superior à aplicação de paclo, embora não significativo (Figura 19D). Os resultados para brix de aplicação de GA aos 16 dias, obtidos em experimentos anteriores, também foram confirmados neste experimento.

Dessa forma conclui-se que tanto a aplicação de paclo, quanto à aplicação de GA, se feitas em determinada fase do desenvolvimento, caracterizada neste trabalho aos 16 dias após a semeadura, podem melhorar a qualidade dos frutos de tomateiro.

Diante dos resultados apresentados pode-se dizer que GA está atuando na relação fonte-dreno de tomateiro e que este experimento pode se tornar uma prática comercial relevante no futuro aplicada a cultivares comerciais.

Figura 19 - A. Peso dos frutos por planta de cada tratamento (n = 8 plantas). B. Número de frutos por planta em cada tratamento (n = 8 plantas). C. Frequência de frutos colhidos de 8 plantas aos 95 dias e separados por categoria de tamanho de fruto (peso). D. Medida da porcentagem do brix de 10 frutos de cada tratamento no final do ciclo. Barras com letras iguais não são diferentes significativamente segundo teste t. (p = 0.05)

2.5 Discussão

O impacto de GA no crescimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro foi avaliado. Resultados iniciais utilizando mutantes deficientes (*gib3*) ou supersensíveis (*pro*) nos levaram a conclusão de que GA pode tanto adiantar quanto atrasar o florescimento. Isso provavelmente se deve ao fato desse hormônio ter tanto um efeito positivo direto quanto um negativo indireto, através da promoção do crescimento vegetativo, na indução floral. Como nos mutantes utilizados o crescimento vegetativo e reprodutivo ocorrem de maneira interligada, em experimentos subseqüentes procurou-se separar essas duas vias do desenvolvimento através de aplicações de um inibidor da biossíntese de GA (paclo) e de GA₃ em momentos específicos do ciclo de vida da planta.

Assim como anteriormente observado por Van den Heuvel et al. (2002), a aplicação de paclo em doses mais elevadas, ou seja, durante 5 idades diferentes em um mesmo tratamento (paclo 5X) provocou uma acentuada redução no tamanho do caule e área foliar, apresentando folhas encarquilhadas e verde escuras, semelhante aos mutantes deficientes em GA de tomateiro (e.x. *gib3*). Do mesmo modo, tais plantas também apresentaram atraso no florescimento, comportamento já relatado no experimento anterior para os mutantes *gib3* e *pro*. Além disso, o tratamento com paclo 5X provocou uma redução significativa na massa dos frutos por planta. No entanto, a aplicação de uma única dose de paclo em plantas de diferentes idades levou a um semi-nanismo que teve efeitos distintos na indução floral e frutificação. Desse modo, tratamentos, como paclo em aos 16 dias após a semeadura, parecem levar a uma redução na altura, sem atrasar o desenvolvimento reprodutivo. Desse modo, esse tipo de tratamento em geral levou a um aumento da massa de seus frutos, quando comparados ao controle. Esses dados corroboram a literatura, onde Berova e Zlatev (2000) observaram que a aplicação de paclo, além de reduzir o tamanho do caule, acelera a formação do fruto e aumenta a produtividade, sem deixar resíduos de paclo nos frutos. Como a aplicação de paclo diretamente no ovário de MT leva a uma redução significativa no pegamento do fruto, conforme já relatado por Serrani et al. (2007), pode se concluir que o efeito da pulverização de paclo na planta inteira por nós realizada teve mais efeito nos órgãos vegetativos, não afetando as flores e ovários, as quais nos estágios aplicados ainda estavam muito pequenas. Por outro lado, Serrani et al. (2007) não observaram redução

do comprimento do caule, já que a aplicação foi feita após o florescimento, onde o crescimento vegetativo já havia ocorrido.

Com relação às aplicações de GA e sua resposta no crescimento vegetativo e reprodutivo, pôde se observar que o tratamento 16d apresentou um adiantamento tanto na formação de botões florais quanto na antese. Isto evidencia que GA pode atuar como um promotor do florescimento de tomateiro, sendo que a observação anterior de atraso no tempo de antese no mutante *pro* ou a formação de um maior número de entrenós quando GA foi aplicado em 5 períodos (GA 5X) deve ser o efeito indireto desse hormônio também favorecendo o crescimento vegetativo. O fato do tratamento GA 5X ter diminuído o tempo de antese, apesar de aumentar o comprimento do entrenó e o número desses no período da antese, é um bom indicativo desse efeito ambíguo do GA, tanto favorecendo o crescimento vegetativo quanto reprodutivo, ainda que às vezes um seja contrário ao outro. O tratamento GA 5X também teve um efeito pronunciado na frutificação diminuindo o peso total de frutos por planta, apesar de aumentar o número de frutos. O efeito de GA aumentando o número de frutos por planta pode ser correlacionado com o fato da aplicação exógena de GA em ovários não polinizados induzir pegamento e desenvolvimento do fruto, embora sem sementes (RAPPAPORT, 1957; GUSTAFSON, 1959; GILLASPY et al., 1993; VRIEZEN et al., 2008). Contudo, apesar de GA promover o pegamento de frutos e estabelecer drenos para os mesmos, a baixa produtividade do tratamento GA 5X evidencia que a pulverização da planta inteira com GA deve ter favorecido também o crescimento de partes não reprodutivas. Há relatos de que GA é pouco translocado por enxertia (VAN DEN HEUVEL et al., 2000), sendo que o GA necessário para o desenvolvimento do ovário deve ser produzido pelo próprio botão floral (VAN DEN HEUVEL et al., 2000) através da regulação da expressão dos vários genes necessários a sua biossíntese nos tecidos reprodutivos (REBERS et al., 1999). Isso leva a crer que o maior pegamento de frutos de GA 5X se deve ao fato de parte do GA pulverizado ter atingido diretamente os botões florais. Já o tratamento aos 16d não teve alteração na produtividade, sendo equivalente ao controle quanto ao peso total dos frutos e número de frutos por planta. Contudo, esse tratamento mostrou ser eficaz para formar frutos com brix elevado, sem afetar negativamente a massa de frutos, além de aumentar a frequência de frutos tipo A e B e a taxa de amadurecimento.

A partir desses resultados, pode se afirmar que, quando a aplicação de GA é feita em determinada fase do desenvolvimento, no caso 16 dias, o mesmo pode ser melhor direcionado para favorecer drenos reprodutivos e consequentemente a qualidade dos frutos. Realizando experimentos com aplicação de GA em tomateiro, Rappaport (1957) observou uma antecipação no florescimento e um aumento no pegamento de frutos, porém sem sucesso no tamanho e quantidade dos frutos, além do aparecimento de frutos sem sementes associadas com pobres características de amadurecimento. À luz dos resultados aqui apresentados, o efeito negativo de GA nos experimentos de Rappaport (1957) deve ter ocorrido devido a uma aplicação de GA em uma fase inadequada do desenvolvimento do tomateiro.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados indicam que tanto a aplicação de inibidor de biossíntese de GA (paclo), quanto de GA_3 , se feitas em determinada fase do desenvolvimento, caracterizada neste trabalho aos 16 dias após a semeadura da cv Micro-Tom, podem melhorar a qualidade dos frutos de tomateiro (teor de sólidos solúveis e maior número de frutos das classes A e B). Diante desses resultados, infere-se que a alteração do conteúdo de GA provavelmente está atuando na relação fonte-dreno do tomateiro, sendo que a aplicação de GA_3 aos 16 de idade favoreceria diretamente os drenos reprodutivos, aumentando assim a qualidade do fruto, enquanto que a aplicação de paclo chegaria ao mesmo resultado por inibir o crescimento vegetativo e, conseqüentemente, favorecer o reprodutivo. Aplicações de paclo ou GA_3 em outras idades podem ter resultado completamente adversos, ou seja, inibir o crescimento reprodutivo (aplicação de paclo) ou exacerbar o crescimento vegetativo (aplicação de GA_3). Essa observação está de acordo com o fato dos frutos figurarem entre os drenos mais importantes, já que necessitam de um contínuo aporte de carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos para o crescimento dos tecidos derivados do ovário (endocarpo, columela e placenta) e do embrião (GILLASPY et al., 1993).

Alterações na relação fonte-dreno devido a GA já provaram ser muito importante para a produção de grãos na agricultura, na chamada Revolução Verde (SILVERSTONE, 2000; HEDDEN, 2003), mas tem sido pouco investigada para a produção de frutos carnosos na horticultura. Nas variedades de trigo e arroz de alta produtividade, mutações específicas na biossíntese (SASAKI et al., 2002) ou

sensibilidade a GA (PENG et al., 1999) levaram a uma diminuição do crescimento vegetativo em detrimento do reprodutivo, elevando assim o índice de colheita. Nossos resultados mostraram que alterações específicas em GA em tomateiro também podem ser favoráveis para a horticultura, embora o parâmetro mais afetado possa não ser a quantidade, mas a qualidade dos frutos.

3 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que tanto a aplicação de paclo, quanto de GA₃, se feitas em determinada fase do desenvolvimento, caracterizada neste trabalho aos 16 dias após a semeadura da cv Micro-Tom, podem melhorar a qualidade dos frutos de tomateiro, sendo esta medida pelo aumento do teor de sólidos solúveis (brix) e pelo maior número de frutos das classes A e B (maiores que 4 g). Diante desses resultados, infere-se que a alteração do conteúdo de GA provavelmente está atuando na relação fonte-dreno do tomateiro, sendo que a aplicação de GA₃ aos 16 de idade favoreceria diretamente os drenos reprodutivos, aumentando assim a qualidade do fruto, enquanto que a aplicação de paclo chegaria ao mesmo resultado por inibir o crescimento vegetativo e, conseqüentemente, favorecer o reprodutivo. Aplicações das mesmas doses de paclo ou GA₃ em outras idades podem ter resultado completamente adversos, ou seja, inibir o crescimento reprodutivo (aplicação de paclo) ou exacerbar o crescimento vegetativo (aplicação de GA₃). Por fim, esses resultados podem ser convertidos em práticas agronômicas relevantes se estendidos a cultivares comerciais.

REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, A.A.; AKOUMIANAKIS, K.A.; OLYMPIOS, C.M.; PASSAM, H.C. The effect of the time and mode of application of gibberellic acid and inhibitors of gibberellin biosynthesis on the dormancy of potato tubers grown from true potato seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, p. 1973-1979, 2007.

ALVEY, L.; HARBERD, N. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 123, p.153-160, 2005.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. v. 1, 438 p.

ATHERTON, J.G.; HARRIS, G.P. Flowering. In: ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. (Ed.). **The tomato crop**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 167-200.

BALUSKA, F.; PARKER, J.S.; BARLOW, P.W.A. Role for gibberellic-acid in orienting microtubules and regulating cell-growth polarity in the maize root cortex. **Planta**, Berlin, v. 191, p. 149-157, 1993.

BASSEL, G.W.; MULLEN, R.T.; BEWLEY, J.D. Procera is a putative DELLA mutant in tomato *Solanum lycopersicum*: effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 585-593, 2008.

BASSEL, G.W.; ZIELINSKA, E.; MULLEN, R.T.; BEWLEY, J.D. Down regulation of DELLA genes is not essential for germination of tomato, soybean, and *Arabidopsis* seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 2782-2789, 2004.

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

BEROVA, M.; ZLATEV, Z. Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, p. 117-123, 2000.

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 of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 1761-1766, 1999.

BLÁZQUEZ, M.A.; WEIGEL, D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 404, p. 889-892, 2000.

BLÁZQUEZ, M.A.; SOOWAL, L.N.; LEE, I.; WEIGEL, D. Leafy expression and flower formation in *Arabidopsis*. **Development**, Washington, v. 124, p. 3835-3844, 1997.

BLÁZQUEZ, M.A.; GREEN, R.; NILSON, O.; SUSSMAN, M.R.; WEIGEL, D. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 791-800, 1998.

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. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 427-431, 1999.

CARVALHO, R. F. **Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CORBESIER, L.; COUPLAND, G. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 54-66, 2008.

DAVID-SCHWARTZ, R.; BADANI, H.; SMADAR, W.; LEVY, A.A.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, p. 561-569, 2001.

DAVIES, P.J. **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 833 p.

DAVIS, T.D.; CURRY, E.A. Chemical of regulation of vegetative growth. **Critical Reviews in Plant Science**, Amsterdam, v. 10, p. 204-216, 1991.

DILL, A.; THOMAS, S. G.; HU, J.; STEBER, C.M.; SUN, T.P. The *Arabidopsis* F-Box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 1392-1405, 2004.

EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 112-117, 2002.

FOS, M.; NUEZ, F.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. The gene pat-2, which induces natural parthenocarp, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 471-480, 2000.

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

GARCÍA MARTÍNEZ, J.L.; HEDDEN, P. Gibberellins and fruit development. In: TOMAS-BARBERAN, F.A.; ROBINS, R.J. (Ed.). **Phytochemistry of fruit and vegetables**. Oxford: Clarendon Press, 1997. p. 263-286.

GILLASPY, G.; BENDAVID, H.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1439-1451, 1993.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. S170-S180, 2004.

GOMEZ, P.; JAMILENA, M.; CAPEL, J.; ZURITA, S.; ANGOSTO, T.; LOZANO, R. Stamenless, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. **Planta**, Berlin, v. 209, p. 172-179, 1999.

GRAY, R.A. Alterations of leaf size end shape and other changes caused by gibberellins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, p. 674-682, 1957.

GROOT, S.P.C.; BRUINSMA, J.; KARSEN, C.M. The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 71, p. 184-190, 1987.

GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSEN, C.M. Gibberellin induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protusion. **Planta**, Berlin, v. 174, p. 500-504, 1988.

GUSTAFSON, F.G. Influence of gibberelic acid on setting and development of fruit in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 35, p. 521-523, 1959.

HEDDEN, P. The genes of the green revolution. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 19, p. 5-9, 2003.

HEDDEN, P.; GRAEBE, J.E. Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 4, p. 111-122, 1985.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A.L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 12, p. 523-530, 2000.

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

HO, L.C.; HEWITT, J.D. Fruit development. In: ATHERTON, J.C.; RUDICH, J. **The tomato crop**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 201-239.

HONG, S.J.; LEE, S.K. Changes in endogenous plant hormones durin ripening of tomato fruits. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 343, p. 220-224, 1993.

HOWE, G.A.; RYAN, C.A. Suppressors of systemin signaling identify genes in the tomato wound response pathway. **Genetics**, Bethesda, v. 153, p. 1411-1421, 1999.

HOWE, G.A.; LIGHTNER, J.; BROWSE, J.; RYAN, C.A. An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 2067-2077, 1996.

IKEDA, A.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SONODA, Y.; KITANO, H.; KOSHIOKA, M.; FUTSUHARA, Y.; MATSUOKA, M. YAMAGUCHI, J. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 999-1010, 2001.

ISAACSON, T., RONEN, G., ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 333-334, 2002.

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

JUPE, S.C.; CAUSTON, D.R.; SCOTT, I.M. Cellular basis of the effects of gibberellin and the pro-gene on stem growth in tomato. **Planta**, Berlin, v. 174, p. 106-111, 1988.

KAMIYA, Y.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 398-403, 1999.

KEBROM, T.H.; BURSON, B.L.; FINLAYSON, S.A. Phytochrome B represses Teosinte Branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1109-1117, 2006.

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

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

KOORNNEEF, M.; ALONSO-BLANCO, C.; PEETERS, A.J.M. Genetics approaches in plant physiology. **The New Phytologist**, London, v. 137, p. 1-8, 1997.

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

KUCERA, B.; COHN, M.A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 15, p. 281-307, 2005.

LANAHAN, M.B.; HO, T-HD. Slender barley: a constitutive gibberellin-response mutant. **Planta**, Berlin, v. 175, p. 107-114, 1988.

LI, K.X.; WANG, Y.N.; HAN, C.Y.; ZHANG, W.S.; JIA, H.Z.; LI, X. GA signaling and CO/FT regulatory module mediate salt-induced late flowering in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 53, p. 195-206, 2007.

LI, L.; LI, C.Y.; HOWE, G.A. Genetic analysis of wound signaling in tomato: evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1414-1417, 2001.

LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B.C.; WINGERD, B.A.; WANG, J.; MARK, E.W.; PICHERSKY, E.; HOWE, G.A. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 126-143, 2004.

LICHTENTHALER, H.K.; ROHMER, M.; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 101, p. 643-652, 1997.

LIFSCHITZ, E.; ESHED, Y. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 3405-3414, 2006.

LIFSCHITZ, E.; EVIATAR, T.; ROZMAN, A.; SHALIT, A.; GOLDSCHMIDT, A.; AMSELLEM, Z.; ALVAREZ, J.P.; ESHED, Y. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 6398-6403, 2006.

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**, Amsterdam, v. 167, p. 753-757, 2004.

LIN, C. Photoreceptors and regulation of flowering time. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 39-50, 2000.

LIPUCCI DI PAOLA, M.; COLLINA, G.F.; SCALA, A. Shoot forming ability of *Lycopersicon esculentum* Mill.: varieties by in vitro cultured cotyledons. **Acta Horticulture**, The Hague, n. 131, p. 111-116, 1983.

MACDONALD, J.E.; LITTLE, C.H.A. Foliar application of GA(3) during terminal long-shoot bud development stimulates shoot apical meristem activity in *Pinus sylvestris* seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, p. 1271-1276, 2006.

MARTI, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; DIXON, M.S.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2037-2047, 2006.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S.K.; CALDWELL, C.G.; LIU, X.L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D.K.; MENASCO, D.J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J.; WAGNER, D.R. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 1689-1703, 2003.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; KOBAYASHI, Y.; YIN, Y.G.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersium* L.) Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 39-44, 2007.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, Y.; LEVY, A.A. A high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 265-274, 2000.

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

MELO, P.C.T. A cadeia agro-industrial do tomate no Brasil: retrospectiva da década de 90 e cenários para o futuro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, 2001. Suplemento. 1 CD-ROM.

MIZOGUCHI, T.; NIINUMA, K.; YOSHIDA, R. Day-neutral response of photoperiodic flowering in tomatoes: possible implications based on recent molecular genetics of *Arabidopsis* and rice. **Plant Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 83-86, 2007.

MONTOYA, T.; NOMURA, T.; FARRAR, K.; KANETA, T.; YOKOTA, T.; BISHOP, G.J. Cloning the tomato curl3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 3163-3176, 2002.

MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, S111-S130, 2002. Supplement.

NAKAMAE, I.J.; PASTRELLO, C.P. Tomate para satisfação do consumidor. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 1999**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Ed. Agros Comunicação, 1999. p. 489-497.

_____. Saladas e molhos diferenciados. **AGRIANUAL 2000**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: Ed. Agros Comunicação, 2000. p. 515-526.

NITSCH, J. Hormonal factors in growth and development. In: HULME, A.C. (Ed.). **The biochemistry of fruits and their products**. New York: Academic Press, 1970. p. 427-472.

OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 133-144, 2006.

OKAMURO, J.K.; SZETO, W.; LOTYSPRASS, C.; JOFUKU, K.D. Photo and hormonal control of meristem identity in the *Arabidopsis* flower mutants *apetala2* and *apetala1*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. L37-47, 1997.

OLSZEWSKI, N.; SUN, T-P.; GUBLER, F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, S61-S80, 2002. Supplement.

PENG, J.R.; RICHARDS, D.E.; HARTLEY, N.M.; MURPHY, G.P.; DEVOS, K.M.; FLINTHAM, J.E.; BEALES, J.; FISH, L.J.; WORLAND, A.J.; PELICA, F.; SUDHAKAR, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J.W.; GALE, M.D.; HARBERD, N.P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, London, v. 400, p. 256-261, 1999.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M-A. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 37-44, 2001.

PHARIS, R.P.; KING, R.W. Gibberellins and reproductive development in seed plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 517-568, 1985.

PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**. 2005. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

QUILES, M.J.; CUELLO, J.; SABATER, B. Phytochrome and hormone control of polypeptides synthesized by chloroplasts of senescent barley leaves. **Revista Espanhola de Fisiologia**, Barcelona, v. 46, p. 279-282, 1990.

RAPPAPORT, L. Effect of gibberelin on growth, flowering and fruiting of the Earlypack tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 32, p. 440-444, 1957.

REBERS, M.; KANETA, T.; KAWAIJE, H.; YAMAGUCHI, S.; YANG, Y-Y; IMAI, R.; SEKIMOTO, H.; KAMIYA, Y. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 241-250, 1999.

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

RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; AIT-ALI, T.; HARBERD, N.P. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signalin. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 67-88, 2001.

RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988.

ROSIN, F.M., HART, J.K.; HORNER, H.T.; DAVIES, P.J.; HANNAPEL, D.J. Over expression of a Knotted-like Homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 106-117, 2003.

SASAKI, A.; ASHIKARI, M.; UEGUCHI-TANAKA, M.; ITOH, H.; NISHIMURA, A.; SWAPAN, D.; ISHIYAMA, K.; SAITO, T.; KOBAYASHI, M.; KHUSH, G.S.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice – New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. **Nature**, London, v. 416, p. 701-702, 2002.

SASTRY, K.; MUIR, R. Gibberellin: effect of diffusible auxin in fruit development. **Science**, London, v. 140, p. 494-495, 1963.

SAWHNEY, V.K.; GREYSON, R.I. Fruit size increase in tomato (*Lycopersicon esculentum*) through gibberellic acid treatment. **American Journal of Botany**, New York, v. 58, p. 460, 1971.

SERRANI, J.C.; SANJUAN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 246-257, 2007.

SILVERSTONE, A.L.; SUN, T.P. Gibberellins and the green revolution. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p.1-2, 2000.

SRIVASTAVA, A.; HANDA, A.K. Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 24, p. 67-82, 2005.

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

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RÖDER, M.S.; WING, R.A.; WU, M.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Bethesda, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

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

THEISSEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 75-85, 2001.

TIEMAN, D.M.; CIARDI, J.A.; TAYLOR, M.G.; KLEE, H.J. Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 26, p. 47-58, 2001.

UEGUCHI-TANAKA, M.; NAKAJIMA, M.; MOTOYUKI, A.; MATSUOKA, M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 183-198, 2007.

UEGUCHI-TANAKA, M.U.; ASHIKARI, M.; NAKAJIMA, M.; ITOH, H.; KATOH, E.; KOBAYASHI, M.; CHOW, T-Y.; HSING, Y-I.C.; KITANO, H.; YAMAGUCHI, I.; MATSUOKA, M. Gibberellin insensitive DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature**, London, v. 437, p. 693-698, 2005.

VAN DEN HEUVEL, K.J.P.T.; HEIJNEN, P.H.F.; BARENDSE, G.W.M.; WULEMS, G. J. Expression of two gibberellin-regulated cDNAs during early flower development in tomato (*Solanum lycopersicon*). Effect of grafting and paclobutrazol. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 108, p. 95-100, 2000.

VAN TUINEN, A.; PETERS, A.H.L.J.; KENDRICK, R.E.; ZEEVAART, J.A.D.; KOORNNEEF, M. Characterisation of the *procera* mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 106, p. 121-128, 1999.

VANDENBUSSCHE, F.; PIERIK, R.; MILLENAAR, F.F.; VOESENEK, L.A.; VAN DER STRAETEN, D. Reaching out of the shade. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, p. 462-468, 2005.

VOGG, G.; FISCHER, S.; LEIDE, J.; EMMANUEL, E.; JETTER, R.; LEVY, A.A.; RIEDERER, M. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 401, p. 1401-1410, 2004.

VRIEZEN, W.H.; FERON, R.; MARETTO, F.; KEIJMAN, J.; MARIANI, C. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. **The New Phytologist**, London, v. 177, p. 60-76, 2008.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2676-2692, 2005.

WATANABE, C.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 33-38, 2007.

WICHARD, M. Paclobutrazol is phloem mobile in castor oil plant (*Ricinus communis* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 16, p. 111-112, 1997.

WILKINSON, J.Q.; LANAHAAN, M.B.; YEN, H.C.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. An ethyleneinducible component of signal-transduction encoded by *Never-ripe*. **Science**, London, v. 270, p. 1807-1809, 1995.

WILSON, R.N.; HECKMAN, J.W.; SOMERVILLE, C.R. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 403-408, 1992.

WING, R.A.; ZHANG, H.B.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning in crop plants: tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of jointless. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 242, p. 681-688, 1994.

YAMAUCHI, Y.; OGAWA, M.; KUWAHARA, A.; HANADA, A.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 367-378, 2004.

YU, H.; ITO, T.; ZHAO, Y.; PENG, J.; KUMAR, P.; MEYEROWITZ, E. M. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 7827-7832, 2001.

ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. Tomato genome is comprised largely of fast evolving low copy number of sequences. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 213, p. 254-261, 1988.

ZEEVAART, J.A.D. Florigen coming of age after 70 years. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1783-1789, 2006.