Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico

Ana Maria Figueira Gomes

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

Piracicaba
2011

Ana Maria Figueira Gomes
Engenheiro Agrônomo

Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico

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
2011

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

Gomes, Ana Maria Figueira
Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico / Ana Maria Figueira Gomes. - - Piracicaba, 2011.
70 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Estresse hídrico 2. Hormônios vegetais 3. Mutação vegetal 4. Raiz 5. Tomate I. Título

CDD 635.642
G633i

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

A meu pai (in memoriam), minha mãe e irmãos,
pela ajuda e incentivo em todos os momentos de minha vida

AGRADECIMENTOS

Assim se faz ciência: de sucessos e fracassos, de momentos de grande alegria e momentos de desespero. Ao longo dos dois anos em que trabalhei no Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal no âmbito do Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, também eu provei essas diferentes sensações. Felizmente em todos os momentos pude contar com apoio de pessoas especiais às quais eu agora agradeço por, de uma forma ou de outra, me terem ajudado a alcançar o objetivo de finalizar este trabalho. Agradeço por isso:

Ao meu orientador, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, por todo o apoio prestado no decurso deste trabalho, discussões enriquecedoras e revisão do manuscrito; pela disponibilidade e por ter partilhado comigo sua experiência e conhecimentos científicos, guiando-me por entre os sinuosos caminhos da ciência. Irei lembrar-me não apenas do seu contributo neste trabalho, mas também da exigência e sabedoria com que sempre me presenteou.

Ao professor Ricardo Kluge, pelos ensinamentos, amizade, simpatia, boa disposição, facultação da minha vinda ao Brasil.

À Solizete Silva, uma mãezona, teve sempre disponibilidade inigualável para me ajudar quando as coisas não me corriam da melhor maneira.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita da ESALQ-USP, por todo o apoio e material disponibilizado.

À Fernanda Arikita, “Japa”, minha amiga e companheira de laboratório, por toda a ajuda e camaradagem: “Acima de tudo por me compreender, e por me fazeres sentir que poderei sempre confiar em ti”.

À Mariana Azevedo e Lillian Pino-Nunes, por toda a ajuda no laboratório, esclarecimento de dúvidas e brincadeiras.

Ao Frederico, pela imensa ajuda, pelas discussões científicas de grande qualidade e por me ter dado outra visão da ciência.

À Cassia, pelo suporte no laboratório e ensinamentos.

Ao Vitti, pela colaboração e ajuda na Casa de Vegetação.

Às pessoas com quem partilhei o laboratório nos últimos tempos: Eloisa, Gabriel, Ivan, Ninfin, Tatiana, Mateus, por terem sido capazes de me compreender (o que é bastante difícil) e contribuir para um bom ambiente de trabalho.

À Mariana Ferraz, pela imensa amizade, companheirismo e momentos divertidos.

A Francynêes Macedo, Luciane Mendes, Fausto Andres, Olehg, Camila, Rafaela, pela imensa amizade, horas de estudo e excelentes momentos que passamos juntos.

Aos meus colegas de Mestrado, por todos os bons momentos que partilhamos.

Ao Nascimento, por todo o amor, carinho, ajuda e incentivo em todos os momentos. “Por continuares a ser o que sempre foste: o melhor amigo que se pode ter, sincero e sempre disponível para me ajudar e ouvir minhas frustrações”.

Ao Osni, por me fazer acreditar que, apesar de na vida nada correr como nos filmes, ela pode ser doce como *ovos moles.*

À minha mãe e irmãos, tão importantes em todos os momentos de minha vida.

A todos aqueles que me esqueci de mencionar, mas que sempre me presentearam com um sorriso ou com uma palavra amiga, peço desculpas, mas nesta fase os lapsos de memória são bastantes.

SUMÁRIO

RESUMO.....9
ABSTRACT 11
LISTA DE FIGURAS 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 DESENVOLVIMENTO.....19
2.1 Revisão bibliográfica 19
2.1.1 Caracterização do tomateiro 19
2.1.2 Hormônios vegetais.....20
2.1.3 Ácido abscísico.....22
2.1.3.1 Mutantes em ácido abscísico 24
2.1.4 Auxinas.....25
2.1.4.1 Mutantes em auxinas 26
2.1.5 Etileno 27
2.1.5.1 Mutantes de etileno 29
2.1.6 Controle hormonal do crescimento radicular sob estresse hídrico 30
2.2 Material e métodos.....33
2.2.1 Material vegetal 33
2.2.2 Cultivo em casa de vegetação 35
2.2.3 Seleção de duplos mutantes 35
2.2.4 Desinfestação e germinação de sementes.....36
2.2.5 Avaliação da regulação hormonal múltipla no crescimento radicular situações de estresse osmótico 37
2.2.6 Tratamento hormonal em situações de estresse osmótico 38
2.3 Resultados 40
2.3.1 Obtenção e otimização do processo de seleção dos duplos mutantes 40
2.3.2 Efeito do estresse osmótico 42
2.3.2.1 Plântulas de Micro- Tom (MT): genótipo controle.....42
2.3.2.2 Plântulas de *sitiens* (*sit*): genótipo deficiente em ácido abscísico (ABA).....44
2.3.2.3 Plântulas de *Never ripe* (*Nr*): genótipo insensível ao etileno 46
2.3.2.4 Plântulas do duplo mutante *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*).....48

2.3.3 Efeito da adição de Ethrel 50
2.3.4 Efeito da sintese do inibidor do etileno (AVG)..... 51
2.4 Discussão 53
3 CONCLUSÕES..... 59
REFERÊNCIAS 61

RESUMO

Interações hormonais no crescimento de raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) sob estresse osmótico

O tomateiro (*Solanum lycopersicum)* tornou-se importante ferramenta para estudos de genética e fisiologia nos últimos anos, devido à disponibilidade de mutantes, incluindo aqueles com alterações hormonais. Nesta cultura, a cultivar ornamental miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT) tem sido utilizada como modelo genético em vários estudos, visto que produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 ml de substrato, completando o ciclo em setenta a noventa dias. Este trabalho foi feito com o intuito de gerar informações que possam colaborar para a compreensão dos mecanismos que determinam a sensibilidade das raízes ao estresse hídrico. Para tal, foram criados duplos mutantes hormonais homozigóticos da cultivar MT, sendo posteriormente usados para verificar o papel das interações hormonais ABA-Etileno no controle do crescimento da raiz sob condições de estresse osmótico. O estudo é relevante pelo fato de que o entendimento dos mecanismos de controle hormonal no crescimento radicular poderá auxiliar a pesquisa de melhoramento genético para a obtenção de plantas tolerantes à seca, o que representaria avanço na agricultura, principalmente para regiões de clima árido e semiárido. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ-USP, onde foram produzidos genótipos de cinco duplos mutantes: *diagetropica/sitiens (dgt/sit)*, *diagetropica/epinastic (dgt/epi)*, *diagetropica/Never ripe (dgt/Nr), sitiens/epinastic (sit/epi)* e *Never ripe/sitiens (Nr/epi)* em homozigose em BC6Fn. Sementes germinadas de (MT) e de mutantes de *sitiens (sit), Never ripe (Nr)* e o duplo mutante *Nrsit* foram colocadas em tratamento com PEG 6000 em diferentes potenciais osmóticos. Também foram realizados experimentos com ácido cloro-2-etil fosfônico (CEPA), um liberador de etileno (Ethrel), e o inibidor da síntese do mesmo, o aminoetoxivinil glicina (AVG), sendo avaliados os parâmetros como crescimento radicular, caulinar, razão raiz/hipocótilo e conteúdo relativo de água (CRA). Observou-se que baixos potencias osmóticos inibem mais o caule que a raiz, e que o estresse osmótico moderado (-0.6 MPa) favoreceu o crescimento da raiz e da razão raiz/hipocótilo em MT, principalmente em *sit* e, em menor extensão, na raiz de *Nr/sit.* Esse crescimento não foi observado em *Nr*. No mutante *sit*, em -1.1 MPa, observou-se inchaço radicular semelhante ao provocado pela presença de etileno. Em menor extensão, esse inchaço também foi observado no duplo mutante *Nr/sit*. Quando adicionado Ethrel, houve inibição do crescimento radicular em *sit e* MT, sendo também observado um pouco de inibição no mutante insensível a etileno, *Nr*. Em estresse moderado (-0.6 MPa), a inibição foi mais severa do que em água para MT, mas não para *sit*, até a dose de 1 µM. A inibição do etileno causada pelo AVG resultou em uma maior diferença entre água e -0.6 MPa, sendo o último mais inibido. Pode-se concluir que, em condições de déficit hídrico moderado, há aumento radicular e da razão/hipocótilo quando comparados a condições normais de suprimento de água. Tais constatações são importantes porque podem ajudar no desenho de práticas agronômicas que podem levar a maior economia de água, bem como aumento da eficiência de uso de água pelas plantas.

Palavras-chave: Estresse osmótico; Mutantes hormonais; Tomateiro; Micro-Tom

ABSTRACT

Hormonal interactions during root growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) under osmotic stress

Tomato (*Solanum lycopersicum*) has become a very important model for genetic and physiological studies in the last years, due to the presence of various mutants, including those with hormonal alterations. The ornamental dwarf tomato cv. Micro-Tom (MT) has been largely used because of its ability to produce viable fruits and seeds in pots of just 50-100 ml, completing its life cycle in seventy to ninety days. In an attempt to gain insights on the mechanisms that regulate plant growth under physiologic stress, homozygote hormonal double mutants of the MT were created and later on screened for the role of hormonal interactions in the control of root growth under osmotic stress. The experiment was conducted at ESALQ-USP Hormonal Control of Plant Development Laboratory, where genotypes of five double mutants namely *diagetropica/sitiens (dgt/sit)*, *diagetropica/epinastic (dgt/epi)*, *diagetropica/Never ripe (dgt/Nr), sitiens/epinastic (sit/epi)* and *Never ripe/sitiens (Nr/epi)* were produced in BC6Fn homozygosis. Germinated seeds of MT and the mutants *sitiens (sit), Never ripe (Nr)* and the double mutant *Nr/sit* were treated with PEG 6000 at different osmotic potentials. There were also experiments with chloro-2-ethyl phosphonic acid (CEPA), an ethylene-releaser (Ethrel) and the inhibitor of ethylene synthesis aminoethyoxyvinyl glycine (AVG). The parameters evaluated were radicle and hypocotyls growth, root/hypocotyl ratio and relative water content (RWC). The stem was more inhibited than the root at moderate osmotic stress (-0.6 MPa), which resulted in elevated root/hypocotyl ratio for MT, *sit* and, in lesser extent, *Nr/sit*. This pattern was not observed in *Nr*. A root swelling similar to that caused by ethylene was observed in *sit* at -1.1 MPa. This swelling was less evident in the double mutant *Nr/sit*. When added Ethrel, there was inhibition of root growth in *sit* and MT. A discrete root inhibition was also observed in the ethylene-insensitive *Nr* mutant. In moderate osmotic stress (-0.6 MPa), root inhibition was more severe than in water for MT, but not for *sit*, until 1 µM Ethrel. The AVG application increased this difference between water and PEG 6000 treatments. It can be concluded that, in moderate water deficit, the root growth and root/hypocotyl ratio were increased, when compared to normal water supply. These findings are important, since they can provide for the better design of agronomic practices and crop improvement aiming at the enhancement of water use efficiency.

Keywords: Osmotic stress; Hormonal mutant; Tomato plants; Micro-Tom

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota biossintética do ácido abscísico (ABA). Alguns mutantes de tomateiro ABA- deficientes estão indicados nas etapas onde são bloqueadas. NCED = 9-cis-epoxicarotenoidde dioxigenase; IPP = isopentenildifosfato (SCHWARTZ; QIN; ZEEVAART, 2003) 24

Figura 2 - Rota de biossíntese de AIA a partir do triptofano. Nos vegetais, a síntese ocorre nos cloroplastos. Adaptado de Normanly, Slovin e Cohen (1995) 26

Figura 3 - Rota biossintética do etileno. O aminoácido metionina é o precursor natural do etileno. SAM = S-adenosilmetionina, que por sua vez é decomposta em ACC = ácido 1-aminociclopropano-1-carbocixílico. A última etapa da via, conversão do ACC em etileno, necessita de oxigênio e é catalizada pela enzima ACC oxidase. A biossíntese pode ser bloqueada por inibidores. AVG = aminoetoxí-vinil-glicina; Ag^{+}= íons de prata; co^{2+} = íons de cobalto; MCP = 1-metilciclopropano; Cks=citocininas; AIA = ácido indol-3-acético; $KMnO_4$ = permanganato de potássio; Co_2=dioxido de carbono em contrações altas. Adaptado de Adams e Yang (1979).....28

Figura 4 - Fenótipos dos mutantes utilizados. (A) Planta controle Micro – Tom (MT); (B) mutante *dgt* - observar caule fino; (C) Mutante *sit* -notar folhas queimadas, devido a murcha; (D) Mutante *Nr* - notar frutos amarelos devido ao não amadurecimento completo; (E) mutante *epi* - notar frutos com bicos e folhas epinásticas.....34

Figura 5 - Fenótipos dos duplos mutantes. A) *dgt/sit*) B) *dgt/epi*; C) *dgt/Nr*; D) *sit/epi*; E) *Nr/sit*; F) Fruto verdes escuro do duplo mutante *dgt/sit*; G) Frutos de *dgt/epi* apresentando uma protuberância na região apical; H) Frutos amarelos do duplo mutante *Nr/dgt* 41

Figura 6 - Efeito de estresse osmótico em plântulas controle o Micro –Tom (MT). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20).....43

Figura 7 - Comparação do aspecto das plântulas de Micro –Tom (MT). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa..... 43
Figura 8 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *sitiens* (*sit*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)..... 45
Figura 9 – Efeito do estresse osmótico no crescimento da raiz e hipocótilo de *sitiens* (*sit*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa - observar entumescimento..... 45
Figura 10 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *Never ripe* (*Nr*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20) 47
Figura 11 – Efeito do crescimento osmótico no crescimento da raiz e do hipocótilo de *Never ripe* (*Nr*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa 47
Figura 12 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)..... 49
Figura 13 – Efeito do estresse osmótico no crescimento da raiz e do hipocótilo de *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa 49
Figura 14 - Efeito da aplicação de etileno no comprimento das raízes em MT e nos mutantes *Nr* e *sit.* A) Água; B) – 0.6 MPa. Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20) 51
Figura 15 – Efeito da inibição da síntese do etileno no comprimento das raízes de MT e dos mutantes *Nr* e *sit.* A) Água; B) – 0.6 MPa. Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20) 52

1 INTRODUÇÃO

Em termos biológicos, o estresse pode ser definido como força adversa ou condição que inibe o funcionamento normal e o bem-estar de um sistema biológico (JONES; JONES, 1989). As plantas estão sujeitas a grande variedade de estresse ambiental, incluindo temperaturas anormais, condições químicas e físicas desfavoráveis do solo, várias doenças e pragas. Contudo, pode-se dizer que o estresse hídrico reduz o crescimento e a produtividade vegetal mais que todos os outros estresses combinados, pois ocorre em qualquer local, mesmo em regiões consideradas úmidas (CUSHMAN; BOHNERT, 2000).

As plantas frequentemente experimentam condições de estresse hídrico quer por excesso, quer por escassez de água. Esse estresse podem ter origem natural – condições climáticas – ou ser deliberadamente provocadas por manejo agrícola durante o ciclo de desenvolvimento da planta, resultando no estímulo ou repressão de determinada característica fisiológica (RIOV et al., 1990; GHASSEMIAN et al., 2000; HANSEN; GROSSMAN, 2000; SHARP et al., 2000; SPOLLEN et al., 2000). Contudo, a capacidade de manipular tais processos só é possível se houver maior entendimento dos complexos mecanismos de regulação hormonal do crescimento das plantas em respostas a fatores internos e externos que levam a situações de estresse.

As plantas respondem às diferentes condições de estresse de diversas formas. Todavia, diferentes tipos de estresse geralmente conduzem a resultados similares. No âmbito celular, o estresse abiótico, em especial o déficit hídrico (desidratação e salinidade), provoca redução do potencial de turgor. Devido à perda de água, os solutos celulares concentram-se e são ativamente acumulados para manter o citosol osmoticamente equilibrado. Esse processo, conhecido como ajuste osmótico é, por conseguinte, fator importante na tolerância ao estresse abiótico (CHERIAN; REDDY; FERREIRA, 2006).

A fim de simular condições padronizadas de estresse osmótico em laboratório, estudos de germinação têm sido realizados com a utilização de soluções aquosas de polietilenoglicol (PEG), por ser um composto químico inerte e pouco tóxico (MURILLO-AMADOR et al., 2002; FANTI; PEREZ, 2004). Também é comum utilizar-se de soluções de sacarose ou manitol. Porém, podem ocorrer complicações fisiológicas decorrentes

do fato de esses açúcares serem metabolizados por algumas plantas, introduzindo uma variável nutricional além do estresse.

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Syn *Lycopersicon esculentum* Mill.) tornou-se um modelo muito importante para estudos de genética e fisiologia nos últimos anos (EMMANUEL; LEVI, 2002). No tomateiro é possível encontrar mutantes que apresentam alterações no metabolismo e/ou sensibilidade a vários hormônios. Em estudos recentes envolvendo análises fenotípicas, Rosado e colaboradores (2006) observaram que existem mutantes com sensibilidade alterada em resposta a mais de um hormônio, indicando que um único componente de sinalização pode atuar em duas ou mais respostas hormonais diferentes. Todas essas descobertas têm trazido ainda mais questionamentos e gerado mais interesse sobre a necessidade de compreender as interações hormonais e a regulação dos mecanismos de crescimento das plantas sob condições adversas.

Uma área que tem despertado muito interesse e controvérsia entre pesquisadores trata da importância da possível interação entre o ácido abscísico e o etileno na mediação do desenvolvimento radicular e foliar em resposta ao déficit hídrico, sendo que, muitas perguntas ainda estão por serem respondidas. Abeles, Morgan e Saltveit (1992) constataram que a produção de etileno pelas plantas é estimulada por diversos tipos de estresse biótico ou abiótico. Contudo, Graves e Gladon (1985) foram além afirmando que o déficit hídrico é um dos principais fatores altamente associados à elevada produção de etileno nas plantas. Em estudo conduzido por Trewavas e Jones (1991), constatou-se que o acúmulo de ácido abscísico é necessário para o estímulo do crescimento radicular e a consequente inibição do desenvolvimento foliar a fim de facilitar a manutenção da planta em condições de baixo potencial hídrico. Tal contatação com a ideia largamente difundida de uma função inibitória do ácido abscísico em condições de escassez ou déficit de água nas plantas. Sharp (2002) propôs o importante papel do ácido abscísico endógeno na manutenção do crescimento da raiz primária em condições de baixo potencial hídrico por meio da inibição da produção de etileno. Devido à controvérsia que rodeia os mecanismos de interação hormonal, principalmente entre ácido abscísico e etileno em condições de estresse, Sharp e Lenoble (2002) afirmaram que o estudo de mutantes com sensibilidade ou

síntese reduzida do ácido abscísico constitui poderosa ferramenta para analisar as interações que ocorrem nas vias de sinalização entre ácido abscísico e etileno. Mais recentemente, Rosado e colaboradores (2006) reforçaram a constatação feita por Sharp e Lenoble (2002), afirmando que o entendimento das interações hormonais tem o potencial para mudar a visão tradicional do papel do ácido abscísico na inibição do crescimento radicular e foliar em condições de estresse hídrico.

Com vista a gerar informações que possam ajudar a cobrir o vazio existente no reconhecimento dos mecanismos que determinam a sensibilidade das raízes ao estresse hídrico, objetivou-se com o presente trabalho criar duplos mutantes hormonais homozigóticos da cultivar Micro-Tom, os quais foram posteriormente usados para verificar o papel das interações hormonais no controle do crescimento da raiz em condições de estresse osmótico. Assim, este trabalho se torna relevante ao se considerar que o entendimento dos mecanismos de controle hormonal no crescimento radicular poderá auxiliar a pesquisa de melhoramento genético para obtenção de plantas tolerantes à seca, o que representaria uma importante contribuição para a agricultura, principalmente em regiões de clima semiárido, onde as plantas experimentam situações de estresse hídrico com frequência.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Caracterização do tomateiro

O tomateiro recentemente foi reclassificado e agrupado no gênero *Solanum* e, por conseguinte, na espécie *Solanum lycopersicum* L. (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006). O tomateiro pertence à ordem Tubiflorae, família Solanaceae e ao gênero *Solanum*. A primeira denominação científica do tomateiro foi dada em 1694 por Tounefort (apud PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006), que o classificou genericamente de *Lycopersicon,* que significa *pêssego de lobo* na língua grega. Por sua vez, Linnaeus (1753 apud PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006), usando o sistema binomial, reclassificou o tomateiro como sendo do gênero *Solanum.* Miller (1754 apud PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006) descreveu e reclassificou o gênero como *Lycopersicon* e várias espécies, incluindo o tomateiro cultivado, que chamou de *L. esculentum*.

Diversos estudos mostraram alta correlação genética entre *Lycopersicon esculentum* e espécies do gênero *Solanum,* e o tomateiro foi reclassificado como *Solanum lycopersicum.* Atualmente, com base em evidências obtidas a partir de estudos filogenéticos utilizando sequência de DNA (SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005) e estudos mais aprofundados de morfologia e de distribuição das plantas, há ampla aceitação entre taxonomistas, melhoristas e geneticistas da nomenclatura *S. lycopersicum* (PERALTA; KNAPP; SPOONER, 2006), conforme consta no Code of Nomenclature for Cultivated Plants (BRICKELL et al., 2004).

Os esforços efetuados para o melhoramento do tomateiro nas últimas quatro décadas resultaram em cultivares adequadas à grande diversidade de condições ambientais, formas de cultivo e destinos da produção. O maior foco desse esforço foi alocado no desenvolvimento de cultivares resistentes as mais importantes doenças, sendo as espécies selvagens relacionadas ao tomateiro frequentemente o único recurso genético para a busca de resistência a doenças. Esse banco genético continua

como fonte de valor incalculável para o melhoramento de tomateiro (JONES et al., 1991).

O tomateiro é excelente modelo para estudo de processos biológicos. Do ponto de vista de modelo genético, o tomateiro possui genoma relativamente pequeno (7,1 x 10^8 pb), mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (RICK; YODER 1988; TANKSLEY, 1993) e ampla riqueza de germoplasma constituída pelas espécies selvagens que podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (STEVENS; RICK, 1986).

Ademais, o tomateiro possui diversidade de metabólitos secundários (TANKSLEY, 1993) e tecidos que facilitam análises bioquímicas, além de apresentar padrão morfogenético diferente de *Arabidopsi*s, colocando o tomateiro como modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (PRATT et al., 1997).

A cultivar miniatura de tomateiro, proposto por Meissner e colaboradores (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-150 ml de substrato, completando o ciclo de vida em setenta a noventa dias. Com essas características, a cultivar Micro-Tom pode crescer em laboratório com a mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis*. O ciclo de vida curto da cultivar Micro-Tom possui a vantagem adicional de facilitar a obtenção de microplantas necessárias aos estudos fisiológicos.

2.1.2 Hormônios vegetais

Hormônios vegetais são substâncias orgânicas, de ocorrência natural, as quais, em baixas concentrações, influenciam processos fisiológicos (DAVIES, 1995). Além dos cinco grupos estabelecidos até então como hormônios: auxina (KELLY; BRADFORD, 1986; HICKS; RAYLE; LOMAX, 1989; ZHANG; LETHAM; JOHN, 1996), citocininas (PINO-NUNES, 2005), ácido abscísico (BURBIDGE et al., 1999; TAYLOR et al., 2000), giberelina (JONES, 1987; KOORNNEEF et al., 1990; BASSEL; BEWLEY; MULLEN, 2008), etileno (FUJINO et al., 1988; WILKINSON et al., 1995), foram descobertas outras classes de compostos capazes de regular o desenvolvimento vegetal como brassinosteróides (MANDAVA, 1988; BISHOP et al., 1999; KOKA et al., 2000;

MONTOYA et al., 2002), ácido jasmônico (SEMBDNER; PARTHIER, 1993), o ácido salicílico (XU et al., 2008), e estrigolactona (KOLTAI et al., 2010).

A auxina foi um dos primeiros hormônios descobertos em plantas. A sua forma mais comum, de ocorrência natural, é o ácido indol-3-acético (AIA). Uma das principais funções da auxina nos vegetais superiores é a promoção da expansão celular, o que reflete no crescimento de vários órgãos em eventos como os tropismos, a partenocarpia, e o crescimento do caule principal (dominância).

As citocininas estão envolvidas em diferentes processos do desenvolvimento, como divisão e diferenciação celular e formação de gemas caulinares (SKOOG; MILLER, 1957; MOK; MOK, 2001). As citocininas são produzidas principalmente nas raízes (VAN STADEN; SMITH, 1978). Porém, outros tecidos meristemáticos como ápices caulinares também podem produzir citocininas, sendo este fato evidenciado em vegetais que não possuem raízes (PERES, 2002).

As giberelinas são hormônios essenciais que controlam muitos aspectos no desenvolvimento das plantas, incluindo a germinação de sementes, arquitetura foliar, alongamento do caule, florescimento e desenvolvimento de sementes (DAVIES, 1995).

O etileno regula o amadurecimento de frutos e outros processos associados com a senescência de folhas e flores, abscisão de frutos e flores, desenvolvimento de pelos radiculares, crescimento de plântulas e abertura do gancho plumular (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992).

O ácido abscísico é o um hormônio vegetal encontrando em todas as plantas vasculares. Ele desempenha várias funções específicas no crescimento e desenvolvimento vegetal. Existem boas evidências de que o ácido abscísico tem um papel no desenvolvimento e dormência primária (FREY et al., 1999). Além disso, os níveis de ácido abscísico em tecidos vegetativos podem ser elevados em resposta a vários estresses ambientais, principalmente à seca. Por estas razões o ácido abscísico é por vezes referido como um hormônio do estresse (ZEEVAART, 1999).

O ácido jasmônico é conhecido como molécula sinalizadora sintetizada por plantas em resposta a ferimentos causados por herbivoria e ao ataque de patógenos (CREELMAN et al., 1992). Dentre os vários efeitos fisiológicos descritos para o ácido jasmônico em plantas de soja *Glycine Max* (L.) Merrill, pode ser citada a regulação da

expressão de genes que codificam proteínas de reserva vegetativa (ANDERSON et al., 1989).

O mecanismo de ação dos brassinosteróides ainda está em fase inicial de investigação. As respostas dos brassinosteróides incluem efeitos sobre a divisão de células (CLOUSE; SASSE, 1998), expansão celular (AZPIROZ et al., 1998), crescimento das plantas (ONO et al., 2000) e inibição de raízes (COLLI, 2004). Eles também participam de processos de tolerância das plantas a estresses, como temperaturas extremas, seca, salinidade e ataque de patógenos (KRISHNA, 2003). Os brassinosteróides regulam a expressão de centenas de genes, sendo importantes para o desenvolvimento vascular, promovendo a diferenciação do xilema e inibindo o desenvolvimento do floema (GREGORY; MANDAVA, 1982).

Ácido salicílico está envolvido no desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida, podendo ativar enzimas antioxidantes em plantas, em respostas a diferentes estresses (XU et al., 2009).

Estrigolactonas foram recentemente identificadas. Pensa-se que elas ou seus derivados atuem como reguladores negativos de ramificação, inibindo o crescimento das gemas axilares recém-formados no caule, encaixando deste modo nas características de um novo grupo de hormônios vegetais (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008; UMEHARA et al., 2008). Recentemente, um novo papel para as estrigolactonas na regulação do desenvolvimento radicular foi descoberto, onde as estrigolactonas mostram ter efeito sobre a alteração da arquitetura da raiz e do alongamento dos pelos radiculares, bem como a sua associação com as mudanças no fluxo de auxinas (KOLTAI et al., 2010). Nos próximos itens serão discutidos os hormônios e mutantes usados neste trabalho.

2.1.3 Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) está envolvido na abertura de estômatos, síntese de proteínas de estoque de sementes, inibição da germinação de embriões imaturos e estresse hídrico. Enquanto algumas dessas respostas ao ABA podem ser rápidas, em

questão de minutos, como é o caso do fechamento de estômatos, outras podem ser mais demoradas e são conhecidas por requererem mudanças na expressão gênica. O ABA tem se mostrado um importante mensageiro químico a longas distâncias, podendo favorecer o crescimento das raízes, em detrimento do sistema caulinar, em condições de estresse hídrico (SAAB et al., 1990).

A biossíntese do ABA (Figura 1) ocorre nos cloroplastos e outros plastídios. A biossíntese do ABA pode-se dividir em três etapas:

1) Síntese dos carotenóides não-oxigenados nos plastídeos;
2) Síntese e clivagem dos carotenóides oxigenados (xantofilas) nos plastídeos, constituído de precursores do ABA;
3) Síntese do ABA no citosol.

A biossíntese não é o único fator de regulação dos níveis de ABA nos tecidos. Assim como para outros hormônios, a concentração livre de ABA no citosol é também regulada pela degradação, conjugação, compartimentalização e transporte. Sob diferentes condições de disponibilidade de água na planta, os níveis de ABA são variáveis, aumentando sob condições de déficit. O ABA pode ser inativado por oxidação (ácido faseico ou diidrofaseico) ou por conjugação com outros compostos, como por exemplo, o ABA-β-D-glicosil-ester (TAIZ; ZEIGER, 2006). O transporte do ABA ocorre tanto via xilema quanto pelo floema, porém, é mais abundante na seiva floemática.

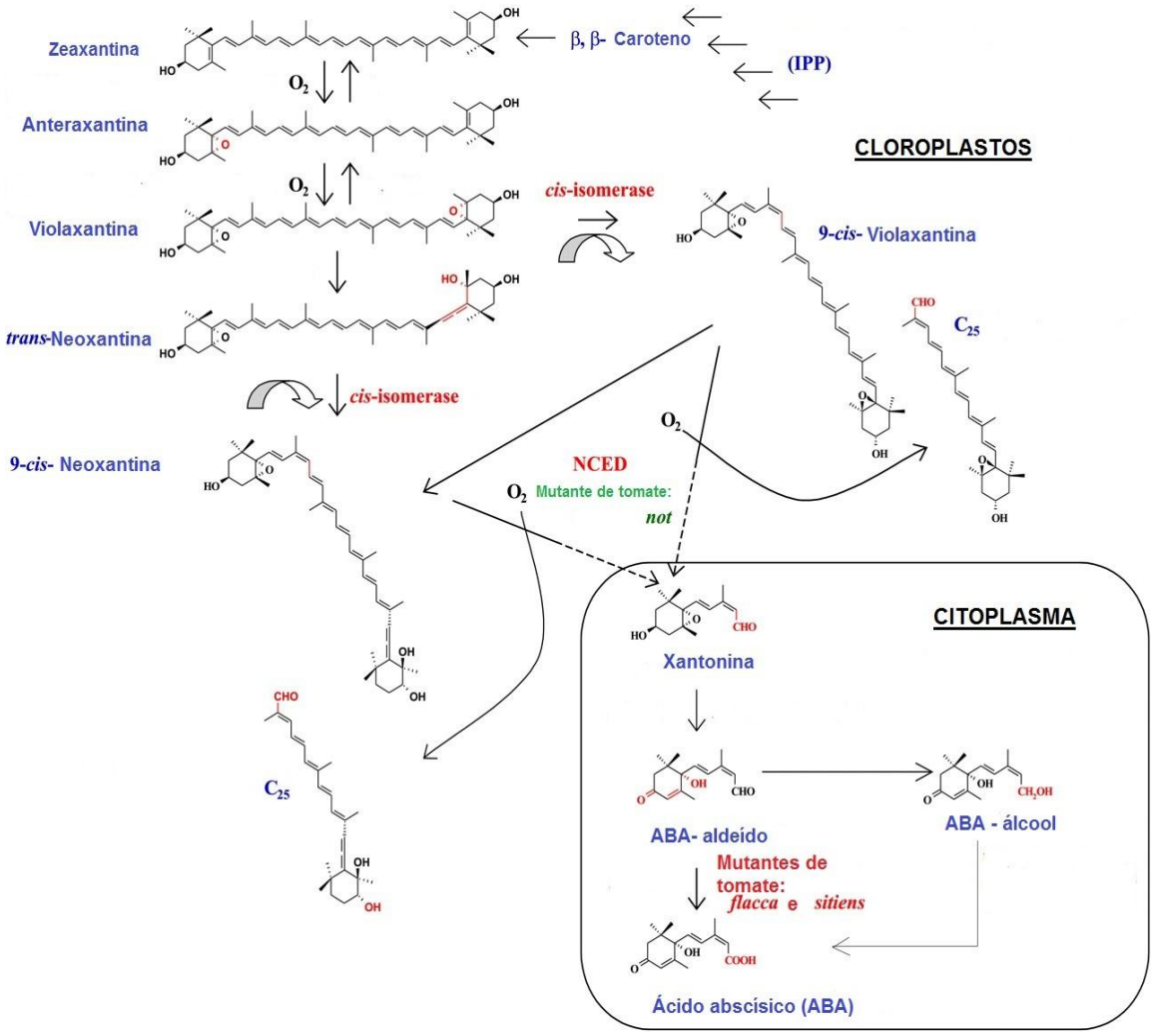

Figura 1 - Rota biossintética do ácido abscísico (ABA). Alguns mutantes de tomateiro ABA- deficientes estão indicados nas etapas onde são bloqueadas. NCED = 9-cis-epoxicarotenoidde dioxigenase; IPP = isopentenildifosfato (SCHWARTZ; QIN; ZEEVAART, 2003)

2.1.3.1 Mutantes em ácido abscísico

Em tomateiro, existem três mutantes clássicos ABA-deficientes: *notabilis (not), flacca (flc) sitiens (sit)* (TAYLOR et al., 2000). O mutante *notabilis (not)* é defectivo para o gene que codifica enzima chave na quebra de carotenoides precursores do ABA, a NCED (9-cis-epoxicarotenoidde dioxigenase). Este mutante apresenta extremo murchamento das folhas sob estresse (BURBIDGE et al., 1997, 1999.). A oxidação do aldeído de ABA está bloqueada nos mutantes de tomateiro *flc* e *sit* (TAYLOR et al.,

2000). Há tendência de murcha das folhas (devido à incapacidade de fechar os estômatos) nesses mutantes. A tendência ao murchamento pode ser evitada pela aplicação de ABA exógeno. As mutações *flc, sit* e *not* de tomateiro são recessivas e produzidas por tratamento com raios x. Apesar da diferença em termos de concentrações do ABA, a característica comum desses mutantes é a viviparidade (TAYLOR et al., 2000) Os mutantes *flc, sit* e *not* também apresentam severa epinastia, das folhas mesmo em condições de não murchamento, o que tem sido atribuído parcialmente a possível excesso de etileno (SHARP et al., 2000).

2.1.4 Auxinas

A principal auxina de ocorrência natural mais abundante e de maior relevância fisiológica é denominada ácido indol-3-acético (AIA). Essa molécula controla a divisão e a expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2006). O AIA regula vários eventos do desenvolvimento vegetal, incluindo o estabelecimento da simetria bilateral no embrião, formação de raízes e dominância apical, bem como respostas ambientais como o gravitropismo e o fototropismo (DAVIES, 1995).

A maior parte do AIA nas plantas é encontrado conjugado, através dos grupos carboxílicos, a uma variedade de aminoácidos, peptídeos e carboidratos (COHEN; BANDURSKI, 1982). As auxinas são sintetizadas em ápices caulinares, primórdios foliares e folhas jovens e também encontradas em flores, frutos e sementes.

As auxinas têm como precursor o triptofano, pelo menos na maioria das espécies vegetais. Entretanto, mutantes de milho e *Arabidopsis* que não sintetizam triptofano ainda produzem AIA (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Assim, os vegetais são aparentemente capazes de produzir esse hormônio essencial através de vias independentes do triptofano (NORMANLY; SLOVIN; COHEN, 1995; LJUNG et al., 2002). A Figura 2 mostra as vias propostas para a biossíntese de AIA a partir do triptofano.

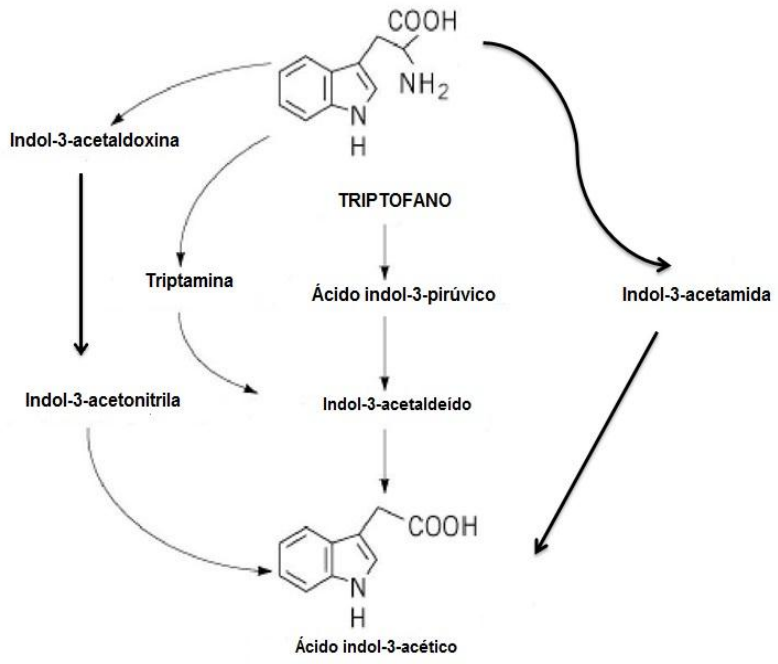

Figura 2 - Rota de biossíntese de AIA a partir do triptofano. Nos vegetais, a síntese ocorre nos cloroplastos. Adaptado de Normanly, Slovin e Cohen (1995)

As auxinas geralmente inibem o desenvolvimento das gemas em função da síntese no meristema apical e do estabelecimento de um gradiente de concentração até o colo da planta. As mesmas auxinas são utilizadas para estimular a formação de primórdios radiculares, sendo, porém, hormônios vegetais produzidos principalmente no caule (DAVIES, 1995).

2.1.4.1 Mutantes em auxinas

Em tomateiro, encontra-se o mutante *diageotropica (dgt),* caracterizado como planta anã, com crescimento diageotrópico dos caules e raízes, e raízes sem ramificação. É defectivo na via de transdução de sinal de auxina, mas o transporte e/ou metabolismo de auxinas não são alterados neste mutante (HICKS et al*.,* 1989; CHRISTIAN et al*.,* 2003). O defeito do mutante *dgt* está associado a alguns eventos primários na ação da auxina (KELLY; BRADFORD, 1986). As plantas de tomateiro

contendo essa mutação são praticamente insensíveis à auxina, afetando processos como crescimento (KELLY; BRADFORD, 1986; MUDAY; LOMAX; RAYLE, 1995; CHRISTIAN; LÜTHEN, 2000; RICE; LOMAX, 2000), expansão da parede celular (DANIEL et al*.,* 1989), expressão de genes de resposta à auxina (MITO; BENNETT, 1995; NEBENFÜHR et al*.,* 2000) e produção de etileno (ZOBEL, 1973; KELLY; BRADFORD, 1986; MADLUNG; BEHRINGER; LOMAX, 1999). Este mutante também apresenta resposta anormal ao gravitropismo (MADLUNG; BEHRINGER; LOMAX, 1999; RICE; LOMAX, 2000). A concentração de AIA nas células do mutante *dgt* é a mesma do tipo selvagem (FUJINO et al*.,* 1988).

Coenen e colaboradores (2002) mostraram que raízes de plantas jovens do mutante *dgt* são sensíveis à auxina, mas perdem a sensibilidade durante o desenvolvimento posterior. Isso sugere que existem várias vias de sinalização de auxina, não sendo todas dependentes da proteína DGT. A via dependente de DGT altera o funcionamento das bombas de H^+ e a expansão da parede celular, as quais são parâmetros que controlam o chamado *crescimento ácido* em resposta à auxina (CHRISTIAN et al., 2003). O mutante *dgt* é defectivo para uma proteína ciclofilina, o que sugere essa molécula como um componente ainda obscuro na via de transdução de sinal da auxina (OH et al., 2006).

2.1.5 Etileno

O etileno participa na regulação do crescimento e expansão das células. Esses efeitos do etileno são comuns no crescimento das partes aéreas de muitas dicotiledôneas, constituindo elemento da resposta tríplice. Em *Arabidopsis,* a resposta tríplice consiste na inibição e entumescimento do hipocótilo (inibição do alongamento da raiz) e no aumento exagerado da curvatura do gancho plumular (ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992).

A via metabólica de síntese de etileno foi determinada por Adams e Yang em 1979. O precursor do etileno é o aminoácido metionina. A conversão da metionina em S-adenosil-metionina (SAM) requer o gasto de uma molécula de ATP e de uma

molécula de H_2O. O oxigênio é essencial no final da reação para que ocorra a conversão de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxilico (ACC) em etileno. Duas enzimas são consideradas chave na síntese do etileno: a ACC sintase, que forma o ACC, e a ACC oxidase, que forma o etileno a partir de ACC em presença de oxigênio. A Figura 3 mostra a via de biossíntese do etileno.

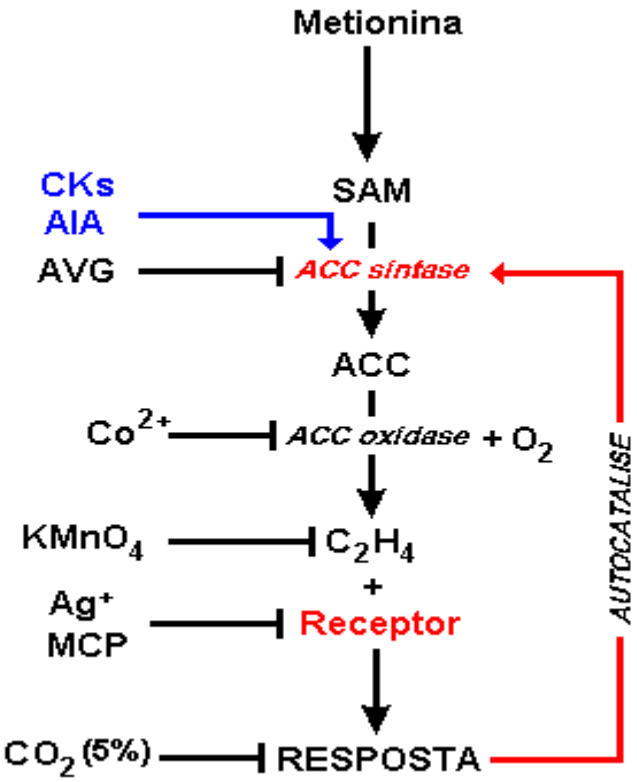

Figura 3 - Rota biossintética do etileno. O aminoácido metionina é o precursor natural do etileno. SAM = S-adenosilmetionina, que por sua vez é decomposta em ACC = ácido 1-aminociclopropano-1-carbocixílico. A última etapa da via, conversão do ACC em etileno, necessita de oxigênio e é catalizada pela enzima ACC oxidase. A biossíntese pode ser bloqueada por inibidores. AVG = aminoetoxí-vinil-glicina; Ag^+= íons de prata; co^{2+} = íons de cobalto; MCP = 1-metilciclopropano; Cks=citocininas; AIA = ácido indol-3-acético; $KMnO_4$ = permanganato de potássio; Co_2=dioxido de carbono em contrações altas. Adaptado de Adams e Yang (1979)

A vantagem original do gás etileno como regulador do crescimento reside no fato de que não exige atividade metabólica para transporte e, em certos casos, para inativação. A difusão do gás através dos espaços intercelulares faz com que seja transportado por toda a planta até o exterior dos tecidos, facilitando o controle de sua concentração nos diferentes tecidos e órgãos. Inúmeras substâncias são capazes de

liberar etileno, dentre elas, a mais utilizada e efetiva é o ácido 2-cloroetil-fosfônico (CEPA), mais conhecido como Ethrel, ethefon. Os inibidores da síntese de etileno são aminoetoxivinilglicina (AVG) e ácido amino-oxiacético (AOA). Esses compostos inibem a enzima ACC sintase, impedindo a conversão de SAM para ACC (YANG, 1987).

2.1.5.1 Mutantes de etileno

O fenótipo da resposta tríplice tem sido utilizado com sucesso para mostrar o isolamento dos componentes da via de transdução de sinal de etileno em *Arabidopsis* e tomateiro (BARRY; LLOP-TOUS; GRIERSON, 2000). O etileno altera o padrão de crescimento de plântulas e leva o aumento de expansão lateral, levando ao entumescimento do epicótilo ou do hipocótilo. Esses efeitos do etileno são comuns no crescimento das partes aéreas de muitas dicotiledôneas, constituindo elemento da resposta tríplice (TAIZ; ZEIGER, 2006). O primeiro mutante insensível ao etileno foi o *etr1,* que bloqueia a resposta de plântulas de *Arabidopsis* ao etileno. O ETR1 foi o primeiro receptor hormonal a ser descoberto, semelhante ao sistema de dois componentes da histidina quinase de bactérias, que consiste de um sensor histidina quinase e um regulador de resposta que pode agir como fator de transcrição. O genoma de *Arabidopsis* codifica quatro proteínas adicionais semelhantes ao ETR1, são elas: ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4, que também funcionam como receptores de etileno. Com base na homologia com *Arabidopsis,* um número grande de componentes da via de resposta ao etileno já foi isolado no tomateiro, incluindo receptores (LASHBROOK; TIEMAN; KLEE, 1998) e genes CTRs (LIN et al*.,* 1998; ZEGZOUTI et al., 1999).

No tomateiro, o *Never ripe (Nr*) é mutado no domínio de ligação com etileno. Tal mutante expressa uma proteína que não pode mais ser desligada pelo etileno, conferindo assim um fenótipo dominante insensível ao etileno. Mesmo que os receptores normais possam ser desligados pelo etileno, os receptores mutantes continuam a sinalizar para a célula a supressão das respostas ao etileno, estando ele presente ou não. O mutante *Nr*, que como o nome sugere forma frutos incapazes de amadurecer, não apresenta resposta tríplice ao etileno (LANAHAN et al., 1994).

Além disso, a senescência tardia da pétala e a não abscisão das flores são comuns ao fenótipo de *Nr*, resultado também da insensibilidade ao etileno, mostrando que o *Nr* foi causada por uma mutação em um membro da família do receptor de genes de etileno em tomate (WILKINSON et al*.,* 1995).

O mutante de tomateiro *epinastic* (*epi)* apresenta superprodução do etileno, com expansão de células alteradas, semelhantes às plantas do tipo selvagem tratadas com etileno. Por exemplo, os caules e pecíolos são mais espessos do que nas plantas tipo selvagem, apresentando curvatura epinástica (aumento exagerado da curvatura do gancho plumular) e folhas com morfologia torcida. Esses efeitos mostram que o *epi* apresenta constitutivamente resposta tríplice, que consiste no encurtamento e engrossamento do hipocótilo, inibição do alongamento da raiz (FUJINO et al*.,* 1988).

Além disso, os inibidores da síntese e da ação de etileno não foram capazes de resgatar o fenótipo *epi*, sugerindo que a mutação pode resultar em uma resposta de etileno constitutiva. Esta hipótese é reforçada pela semelhança do fenótipo de plântulas *epinastic* ao da plântula de mutantes *Arabidopsis* CTR1, cujo fenótipo também não foi revertido quando cultivado em inibidores de etileno (KIEBER et al*.,* 1993).

Tem-se investigado a suposta resposta constitutiva de etileno do mutante *epinastic* com o auxílio de um duplo mutante, incluindo alelos de insensibilidade ao etileno (*epi/ epi; Nr/ Nr*). Os resultados indicam que o mutante *epi,* ao contrário do CTR1 de *Arabidopsis*, não demonstra resposta constitutiva global ao etileno.

2.1.6 Controle hormonal do crescimento radicular sob estresse hídrico

A importância do crescimento das raízes para manter o rendimento das culturas é cada vez mais reconhecida e de crescente interesse para os melhoristas de plantas (GEWIN, 2010). O crescimento das raízes no solo pode ser limitado por características físicas, químicas e biológicas do solo. Muitos trabalhos já foram realizados sobre esse tema, embora o entendimento básico sobre fatores que limitam o crescimento das raízes é insuficiente. Ainda são pouco conhecido os períodos do desenvolvimento em que as condições de água do solo e o tempo de exposição a tais condições podem

influenciar no crescimento radicular, além da interação entre condição do solo e momento do desenvolvimento radicular. Desse modo, o estudo da regulação hormonal do crescimento radicular é de grande interesse, embora seja uma área bastante complexa.

Mutantes deficientes na sensibilidade ou na síntese de ácido abscísico se tornaram poderosa ferramenta para a analise das interações que ocorrem entre o ácido abscísico e o etileno, com potencial para mudar a visão tradicional do papel o ácido abscísico em inibir o crescimento (ROSADO et al., 2006).

Sharp (2002) discute que para manter o crescimento de raízes primárias de milho sob condições de baixo potencial hídrico é necessário acúmulo de ácido abscísico. O autor observou que quando plântulas de milho são conduzidas sob potenciais hídricos de -1.6 MPa o conteúdo de ABA na zona de crescimento da raiz aumenta cerca de cinco vezes.

O crescimento da raiz é geralmente menos inibido do que o crescimento da parte aérea, quando as plantas crescem em solo seco, sendo, portanto, óbvia a necessidade de manter um fornecimento ideal de água (SHARP; DAVIES, 1985). Algumas interpretações destes e outros estudos similares se apóiam na suposição de que, quando o ácido abscísico é aplicado em plantas bem irrigadas, há aumento de seu nível, semelhante a aumentos observados em plantas sob estresse hídrico. Os efeitos sobre o crescimento são os mesmos dos resultados de acúmulo endógeno de ácido abscísico submetidas ao estresse hídrico (HARTUNG; RADIN; HENDRIX, 1988; BACON; WILKINSON; DAVIS, 1998).

Em tomateiro, os estudos demonstram importante papel para o ácido abscísico endógeno, que restringe a produção de etileno em regime de baixo potencial hídrico (SHARP et al., 2000; SPOLLEN et al., 2000; LENOBLE; SPOLLEN; SHARP, 2004). Em plantas combinando deficiência de ácido abscísico e estresse hídrico, a taxa de produção de etileno aumentou grandemente (SHARP; LENOBLE, 2002), sendo que esse efeito foi completamente impedido quando níveis normais de ácido abscísico foram restaurados (SPOLLEN et al., 2000). Estudos recentes mostram que os aumentos da concentração de ácido abscísico são necessários para impedir a excessiva produção de etileno nos tecidos sob estresse hídrico. Como resultado, o

acúmulo de ácido abscísico durante o estresse hídrico, frequentemente pode ajudar no crescimento radicular em vez de inibi-lo (SHARP; LENOBLE, 2002).

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

Estudo semelhante foi realizado por Peres, Zsögön e Kerbauy, (2009), onde quantificados teores endógenos do ácido indol-3-acético (AIA) e do ácido abscísico (ABA) em raízes de orquídea (*Catasetum fimbriatum*) cultivadas *in vitro* em sacarose e manitol. Foi observado um crescimento máximo das raízes em estresse osmótico moderado, sugerindo que o estresse moderado promove o crescimento radicular das orquídeas. Além disso, os conteúdos de ambos ABA e AIA aumentaram com aumento do estresse osmótico.

Pode-se concluir, então, que os hormônios, ácido abscísico, auxina e etileno controlam o crescimento radicular sob estresse hídrico, interagindo de um modo dinâmico e complexo e ainda não elucidado. Assim, é de extrema importância à realização de estudos, utilizando novas abordagens, para compreender as interações hormonais sobre crescimento e desenvolvimento das plântulas submetidas estresse osmótico.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Este trabalho foi conduzido nas instalações do Laboratório de Controle Hormonal da Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Foram utilizadas sementes de tomateiro MT (controle), mutantes de *sit, epi, dgt e Nr,* descritos na Tabela 1 e apresentados na Figura 4.

Os mutantes utilizados foram introgredidos na cultivar Micro-Tom em projetos anteriores do laboratório (PERES et al., 2004; CARVALHO et al., 2008; PINO-NUNES, 2005; 2009), cuja utilidade já foi demonstrada em publicações recentes (ZSÖGÖN et al., 2008; CAMPOS et al., 2009; GRATÃO et al., 2009; LIMA et al., 2009).

Tabela 1 - Mutações hormonais introgredidas na cultivar Micro – Tom e utilizadas no presente trabalho

Mutantes	Cromossomo*	Classe	Efeito e função gênica	Característica morfológica	Ref.
diageotropica (dgt)	1	Auxina	Baixa sensibilidade. Defectivo para uma proteína do tipo ciclofilina	Planta anã, raízes sem ramificação, folhas hiponásticas.	Oh et al. (2006)
Never ripe (Nr)	9	Etileno	Baixa sensibilidade. Defectivo para um receptor de etileno	Frutos não amadurecem totalmente. Retenção de pétalas e anteras não senescentes	Wilkinson et al. (1995)
epinastic (epi)	4	Etileno	Alta produção de etileno. Função gênica desconhecida	Epinastia severa, caules e pecíolos dilatados, raízes muito ramificadas	Fujino et al. (1988)
sitiens (sit)	1	ABA	Deficiência de ABA. Defectivo para o gene que codifica ABA-aldeído oxidase	Planta pequena e fraca, folhas pequenas com supermurchamento sob estresse	Taylor et al. (2000)

*Os números indicados correspondem ao cromossomo dentro de cada um dos 12 cromossomos de tomateiro. ABA = ácido abscísico

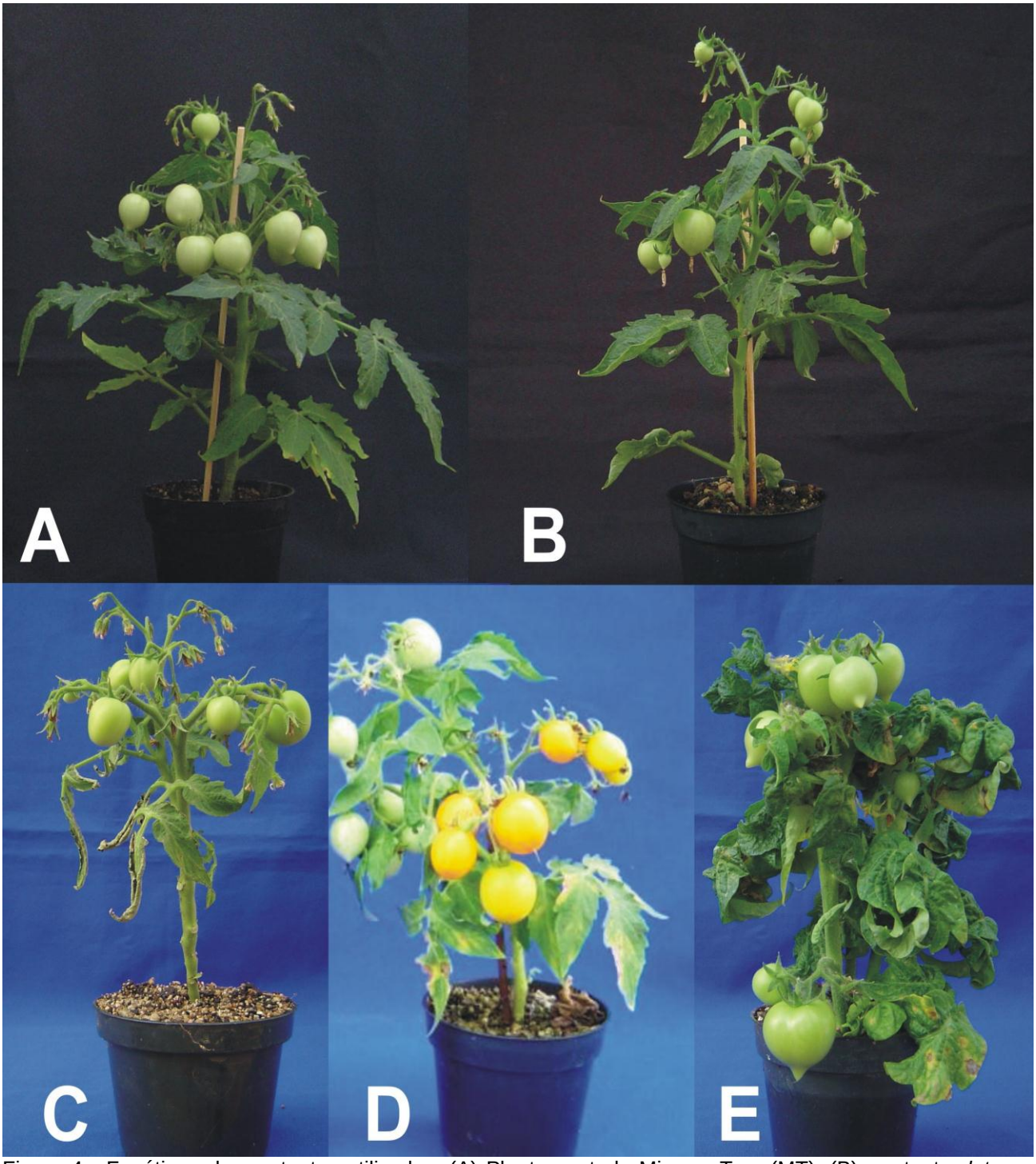

Figura 4 - Fenótipos dos mutantes utilizados. (A) Planta controle Micro – Tom (MT); (B) mutante *dgt* - observar caule fino; (C) Mutante *sit* -notar folhas queimadas, devido a murcha; (D) Mutante *Nr* - notar frutos amarelos devido ao não amadurecimento completo; (E) mutante *epi* -notar frutos com bicos e folhas epinásticas

2.2.2 Cultivo em casa de vegetação

Os duplos mutantes foram produzidos utilizando a Casa de Vegetação e os protocolos de cultivo e cruzamentos do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal da ESALQ-USP. A Casa de Vegetação apresenta condições de temperatura controlada e irrigação automatizada, sendo projetada para cultivo simultâneo de grande número de genótipos de tomateiro, com ênfase no modelo Micro-Tom (MT). As plantas no porte MT são cultivadas em vasos de 150 g de substrato constituído de 1:1 plantmax HT + vermiculita. Para cada 1,0 L dessa mistura, foram adicionados 4 g de calcário e 1 g de NPK 10-10-10. As sementes foram coletadas de frutos maduros, juntamente com a polpa, e mantidas durante dois dias sob fermentação, num copo plástico contendo água e fermento biológico liofilizado para facilitar a retirada da mucilagem que adere ao redor da semente. Em seguida, o fermentado foi despejado em uma peneira, na qual ficaram retidas apenas as sementes. Estas foram lavadas em água corrente, despejadas e espalhadas sobre papel, sendo deixadas para secar ao ar livre durante dois dias. As sementes foram retiradas do papel com auxílio de uma régua de plástico, colocadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em caixas plásticas contendo dessecante (sílica ou sulfato de cálcio) sob refrigeração (de 7 a 14º C).

2.2.3 Seleção de duplos mutantes

A formação dos duplos mutantes se deu por meio de cruzamentos com mutantes simples já estabelecidos dentro da cultivar Micro-Tom (Tabela 1). Plantas geradas nos cruzamentos entre os genótipos da Tabela 1 e Figura 4 foram consideradas geração F1 e autofecundadas, gerando sementes F2, as quais foram semeadas em bandeja. Na geração F2, foram selecionadas plantas com o fenótipo de um dos mutantes (descritos na Tabela 1). Isso foi feito para garantir que uma das mutações esteja presente na planta. Na geração F3, advindas de um dos mutantes, foram buscadas plantas com fenótipo alterado, o que deve representar a homozigose da segunda mutação recessiva. Desse modo, em F3 poderão ocorrer as seguintes situações:

a) todas as plantas continuam apresentando o fenótipo da mutação hormonal selecionada em F2. Nesse caso, a referida mutação deve ser epistática à outra mutação;

b) algumas plantas possuirão fenótipo das plantas com a outra mutação, indicando que esta é epistática à mutação hormonal em questão;

c) algumas plantas terão fenótipo intermediário (o qual já pode ter sido observado em F2) devido ao efeito conjunto das duas mutações. Uma vez que duplos mutantes para as interações hormonais sugeridas neste trabalho não foram ainda descritos em bibliografia, características morfológicas e referências bibliográficas demonstradas na Tabela 1 serviram como referencial na descrição das mesmas e na seleção de duplos mutantes.

No caso da obtenção de duplos mutantes contendo a mutação *Nr*, a qual é dominante, foram necessários teste de progênie para definir se o duplo mutante é homozigoto. O teste de progênie consistiu em cruzar plantas duplos mutantes contendo *Nr* com o parental recorrente (MT). As plantas que só geraram plântulas mutantes (resistentes a 100 µM de Ethrel) foram consideradas homozigotas.

2.2.4 Desinfestação e germinação de sementes

As sementes foram esterilizadas superficialmente em solução de 5% de desinfetante comercial, o qual contém 2% de hipoclorito de sódio (NaCl) acrescido de uma gota de detergente comercial para cada 100 ml da solução.

A desinfestação durou cinco minutos sob agitação (100 rpm). Após desinfecção, as sementes foram lavadas cinco vezes com água destilada. As sementes foram previamente germinadas em água destilada, a fim de selecionar lotes de germinação uniforme para os tratamentos. Sementes com a radícula recém-emitida, processo que leva em média dois dias, foram utilizadas nos tratamentos. Para as medições do crescimento, foram utilizadas dez plântulas por gerbox, sendo utilizados três gerboxes para cada tratamento (n = 30).

2.2.5 Avaliação da regulação hormonal múltipla no crescimento radicular situações de estresse osmótico

As sementes recém-germinadas dos mutantes *sit* e *Nr* e do duplo *Nr/sit* e o controle MT foram colocados em caixa de gerbox pretas contendo folha de papel de filtro e 30 ml de cada solução de tratamento. Os tratamentos consistiram de estresse osmótico obtido com polietilenoglicol (PEG 6000), como descrito a seguir:

1) Água = 100 ml de água destilada + 0 de PEG 6000
2) - 0.05 MPa = 100 ml de água destilada + 5,01 g de PEG 6000
3) - 0.1 MPa = 100 ml de água destilada + 07,85 g de PEG 6000
4) - 0.2 MPa = 100 ml de água destilada + 11,96 g de PEG 6000
5) - 0.3 MPa = 100 ml de água destilada + 15,14 g de PEG 6000
6) - 0.4 MPa = 100 ml de água destilada + 17,83 g de PEG 6000
7) - 0.5 MPa = 100 ml de água destilada + 20,21 g de PEG 6000
8) - 0.6 MPa = 100 ml de água destilada + 22,37 g de PEG 6000
9) - 0.7 MPa = 100 ml de água destilada + 24,35 g de PEG 6000
10) - 0.8 MPa = 100 ml de água destilada + 26,19 g de PEG 6000
11) - 0.9 MPa = 100 ml de água destilada + 27,93 g de PEG 6000
12) - 1.0 MPa = 100 ml de água destilada + 29,57 g de PEG 6000
13) - 1.1 MPa = 100 ml de água destilada + 31,13 g de PEG 6000

As quantidades de PEG 6000 para atingir os potenciais osmóticos determinados acima foram obtidas na tabela de potencial osmótico em função da concentração (molalidade) de PEG calculada por Villela, Doni-Filho e Sequeira (1991). Foi considerado 1 MPa = 10 atm ~1 bar. As sementes germinadas foram deixadas nos gerboxes contendo os tratamentos por seis dias em temperatura ambiente 25º C ± 2º C. Posteriormente foi avaliado o comprimento do hipocótilo, da raiz e razão raiz/hipocótilo. Em cada tratamento, também foi avaliado o Conteúdo Relativo de Água (CRA), o qual é dado pela equação (1):

$$\text{CRA}\ (\%)\ = \frac{\text{W} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \qquad (1)$$

Em que:

W – massa fresca da amostra

TW – massa da amostra túrgida (após 4 h em água)

DW – massa seca da amostra (80ºC por 24 h)

Medidas de Conteúdo Relativo de Água (CRA) foram tomadas para cada genótipo ao longo do experimento, com três repetições. Dez raízes de plântulas com radículas foram pesadas em balança de precisão. Em seguida, foram colocadas em placas de Petri contendo água destilada suficiente para cobri-las e posteriormente armazenadas a 25°C por um período de 4h, para ser novamente pesadas. Logo após, foram colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 80°C por um período de 24 h, para serem pesadas pela última vez. Dessa maneira, foi determinado respectivamente o peso da massa fresca, túrgida e seca das plântulas. O CRA foi dado em porcentagem segundo a expressão acima.

2.2.6 Tratamento hormonal em situações de estresse osmótico

Nos tratamentos hormonais, as sementes germinadas dos duplos mutantes e de MT foram colocadas em caixas de Gerbox pretas com uma folha de papel de filtro embebida em água e em solução de PEG com potencial osmótico.

Para efeito de adição de etileno no crescimento das raízes, as sementes germinadas de MT e os mutantes simples, *sit,* e *Nr*, foram tratados com diversas concentrações de ácido cloroetilfosfônico (Ethrel). Para obter uma solução 10 mM de Ethrel, utilizaram-se 0,22 ml de solução estoque 4600 mM em 100 ml de água. A solução foi posteriormente diluída para obter as soluções descritas na Tabela 2.

.

Tabela 2 - Memória de cálculo para as soluções de Ethrel

Tratamentos	Composição
Água	30 ml de água
0,05 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 0,05 mM
0,1 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 0,1 mM
0,5 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 0,5 mM
1,0 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 1,0 mM
5,0 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 5,0 mM
10 µM de Ethrel (em água)	30 ml de água + 30 µl de Ethrel 10 mM
PEG (- 0,6 MPa)	30 ml de - 0,6 PEG
0,05 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 0,05 mM
0,1 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 0,1 mM
0,5 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 0,5 mM
1,0 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 1,0 mM
5,0 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 5,0 mM
10 µM de Ethrel (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de Ethrel 10 mM

Após seis dias em temperatura ambiente, o comprimento das raízes foi determinado com um paquímetro.

Para efeito de inibição do etileno, o mesmo procedimento foi usado, com as sementes germinadas embebidas em diversas concentrações de AVG (aminoetoxivinilglicina), com água e solução de PEG com potencial osmótico de – 0.6 MPa. A fim de não alterar o volume determinado de 30 mL em cada gerbox, foram feitas soluções estoques de AVG de modo a adicionar somente 30 µl de AVG destas para obter a concentração desejada de AVG (Tabela 3). Para obter uma solução de 10 mM de AVG, utilizou-se 1,32 g de AVG a 15% em 100 ml de água. A solução foi posteriormente utilizada na preparação das soluções da Tabela 3.

Tabela 3 - Memória de cálculo para as soluções de AVG

Tratamentos	Composição
Água	30 ml de água
0,1 µM de AVG (em água)	30 ml de água + 30 µl de AVG 0,1 mM
0,5 µM de AVG (em água)	30 ml de água + 30 µl de AVG 0,5 mM
1,0 µM de AVG (em água)	30 ml de água + 30 µl de AVG 1,0 mM
5,0 µM de AVG (em água)	30 ml de água + 30 µl de AVG 5,0 mM
10 µM de AVG (em água)	30 ml de água + 30 µl de AVG 10 mM
PEG (-0,6 MPa):	30 ml de -0,6 PEG
0,1 µM de AVG (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de AVG 0,1 mM
0,5 µM de AVG (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de AVG 0,5 mM
1,0 µM de AVG (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de AVG 1,0 mM
5,0 µM de AVG (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de AVG 5,0 mM
10 µM de AVG (-0.6 MPa)	30 ml de - 0,6 MPa + 30 µl de AVG 10 mM

2.3 Resultados

2.3.1 Obtenção e otimização do processo de seleção dos duplos mutantes

A partir dos cruzamentos entre mutantes simples dentro da cultivar Micro-Tom, foram produzidos os seguintes duplos mutantes: *diagetropica/sitiens* (*dgt/sit), diagetropica/epinastic (dgt/epi), diagetropica/Never ripe (dgt/Nr), sitiens/epinastic (sit/epi) e Never ripe/sitiens (Nr/sit)* (Tabela 4). Para otimizar o processo de seleção destes duplos mutantes, a sua seleção foi feita em uma população segregante buscando o fenótipo das duas mutações representativas dos progenitores em questão em uma única planta. Partindo do princípio que até o momento em que este trabalho foi feito, nenhum dos duplos mutantes aqui produzidos fora relatado na literatura, houve necessidade de definir as principais características fenotípicas para as quais a seleção foi feita. Os mutantes foram triados em função de características do caule, do sistema radicular, das folhas e amadurecimento dos frutos (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição das características dos duplos mutantes

Duplo mutantes	**Característica morfológica**
dgt/sit	Planta de pequeno porte e caule fino. Folhas murchas, tornando-se necróticas devido ao excesso de perda de água (Figura 5A). Sistema radicular pouco desenvolvido, com raízes pequenas. Antes da maturação, os frutos apresentam coloração verde escura (Figura 5F).
dgt/epi	O caule da planta com maior diâmetro que *dgt*. Folhas epinásticas e com coloração verde escura. Pecíolos dilatados, raízes muito ramificadas, superficiais e aparentes na superfície do solo. Os frutos apresentam uma protuberância na região apical (Figura 5G).
dgt/Nr	Planta apresenta caules que tendem a crescer paralelamente à superfície do solo (pequena resposta geotrópica), Frutos amarelos não amadurecem totalmente (Figura 5H).
sit/epi	Planta com caules e pecíolos caracterizados por epinastia severa e dilatados, raízes muito ramificadas, fruto verde escuro. Os frutos apresentam também uma protuberância na região apical semelhante ao duplo *dgt/epi.*
Nr/sit	Planta de porte pequeno e caule fino. Folhas queimadas devido ao excesso de perda de água (Figura 5E). Antes da maturação, os frutos apresentam coloração verde escuro e também não amadurecem completamente, assim com *dgt/Nr.*

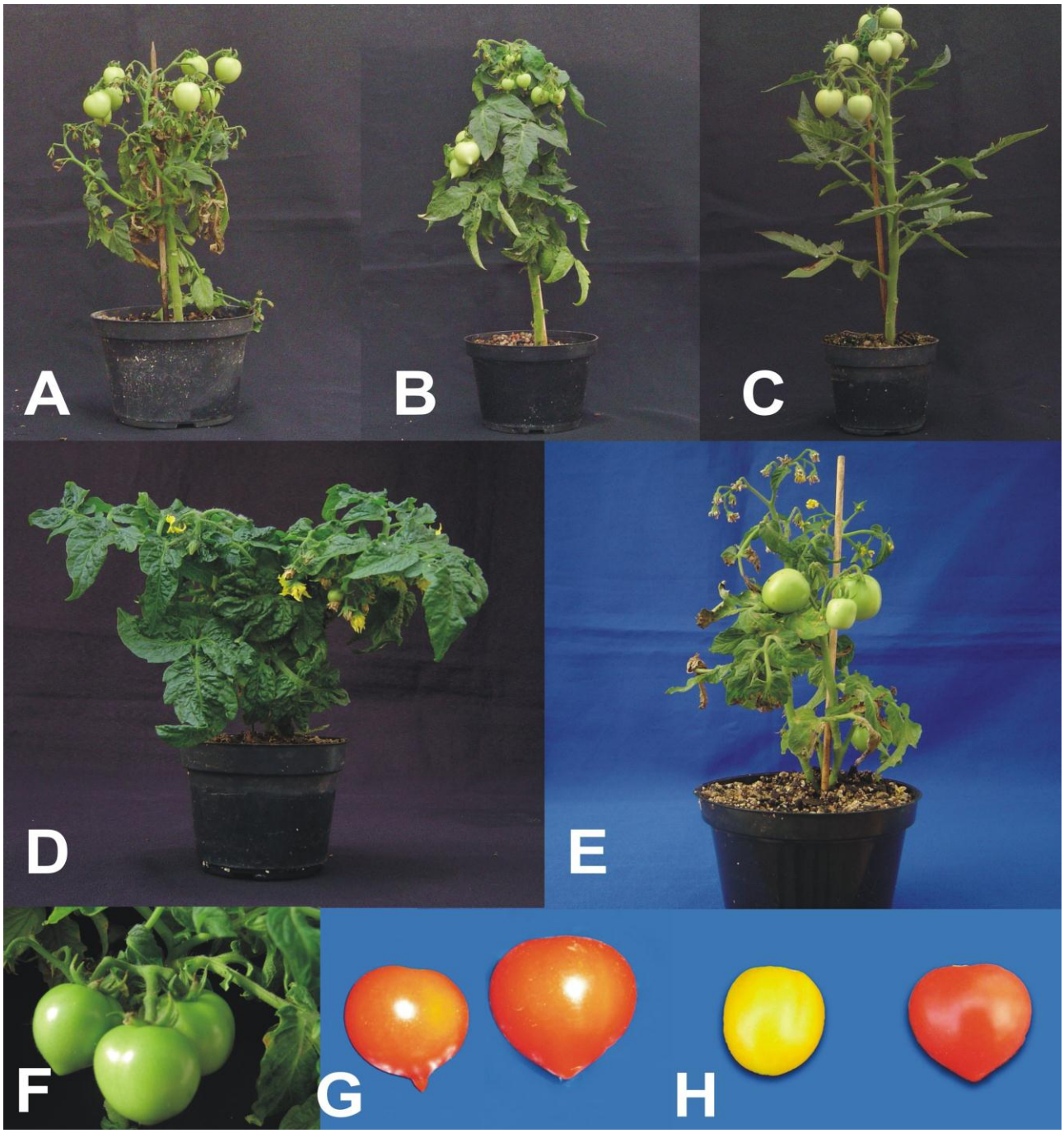

Figura 5 - Fenótipos dos duplos mutantes. A) *dgt/sit*) B) *dgt/epi*; C) *dgt/Nr*; D) *sit/epi*; E) *Nr/sit*; F) Fruto verdes escuro do duplo mutante *dgt/sit*; G) Frutos de *dgt/epi* apresentando uma protuberância na região apical; H) Frutos amarelos do duplo mutante *Nr/dgt*

2.3.2 Efeito do estresse osmótico

2.3.2.1 Plântulas de Micro- Tom (MT): genótipo controle

As plântulas de MT apresentam comprimento do hipocótilo de 48,64 mm em água (Figura 6A). Os valores deste parâmetro decresceram gradativamente em função da redução do potencial osmótico, atingindo o valor mínimo de 6,25 mm de comprimento sob potencial osmótico de -1.1 MPa.

O comprimento da raiz de MT em água foi de 54,78 mm (Figura 6B e 7A). Entretanto, o potencial osmótico de - 0.6 MPa favoreceu o crescimento a um valor ligeiramente maior do que observado em água 57,75 mm (Figura 6B e 7B). A partir de -0.7 MPa, o comprimento da raiz decresceu de forma continua, atingindo o valor mínimo de 10,82 mm sob -1.1 MPa (6B e 7C).

Os valores para razão raiz/hipocótilo aumentaram de forma linear até -0.6 MPa, iniciando com 1,15 em água e atingindo o valor máximo de 3,34 sob -0.6 MPa (Figura 6C). Em concordância com os dados observados para os valores de comprimento da raiz, os valores raiz/hipocótilo caíram continuamente até o valor de 1.65 sob -1.1 MPa.

O Conteúdo Relativo de Água (CRA) apresentou o valor de 71,66 % em água. Os valores decrescem à medida que diminui o potencial osmótico, atingido um valor mínimo de 26,72% sob -1.1 MPa (Figura 6D).

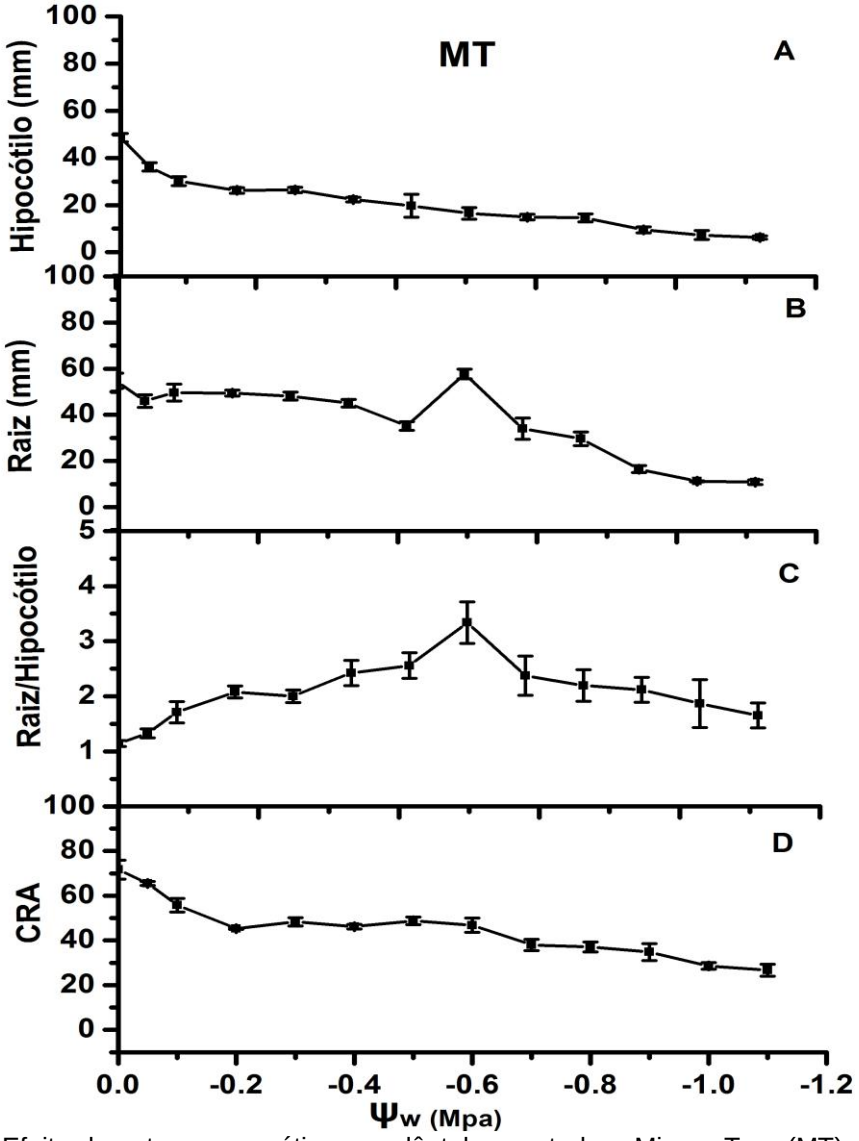

Figura 6 - Efeito de estresse osmótico em plântulas controle o Micro –Tom (MT). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

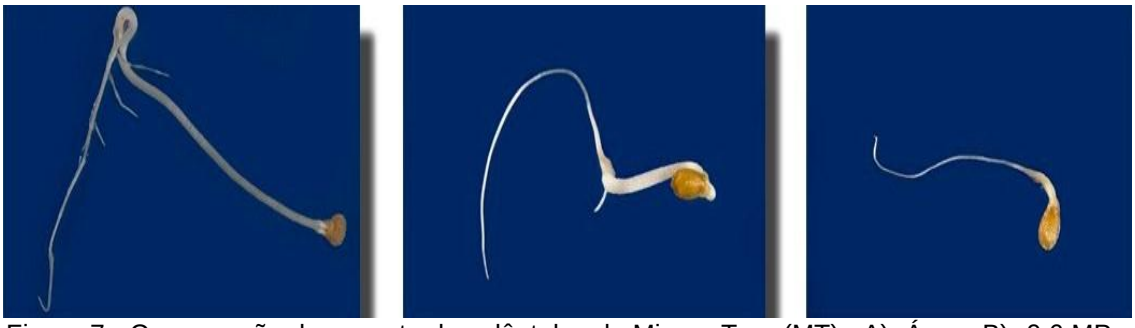

Figura 7 - Comparação do aspecto das plântulas de Micro –Tom (MT). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa

2.3.2.2 Plântulas de *sitiens* (*sit*): genótipo deficiente em ácido abscísico (ABA)

Observa-se na Figura 8A que o hipocótilo diminuiu significativamente de 36,40 mm em água, para 5,15 mm em potencial osmótico de -1.1 MPa.

Em relação ao efeito do estresse osmótico em *sit* (Figura 8B e 9A) constatou- se, efeito semelhante ao das plântulas de MT. O potencial osmótico de -0.6 MPa favoreceu um crescimento, ligeiramente maior que em condições ótimas de suprimento de água (Figura 8B e 9B). A partir de -0.7 MPa o crescimento da raiz decresceu de forma continua, atingindo o valor mínimo de 7,6 mm sob -1.1 MPa (Figura 8B e 9C). Na Figura 9C, verificou-se um entumescimento do hipocótilo para mutante *sit*.

Os resultados obtidos para razão raiz/hipocótilo de *sit* aumentaram linearmente até -0.6 MPa, iniciando com valor de 0,96 em água e atingindo o valor máximo de 3,10 sob -0.6 MPa. Em concordância com os dados observados para os valores de comprimento da raiz, os valores raiz/hipocótilo decresceram continuamente até o valor de 1,50 sob -1.1 MPa (Figura 8C).

Para o Conteúdo Relativo de Água (CRA) observa-se o valor de 62,21 % em água que decrescem à medida que diminuem o potencial osmótico atingido um valor mínimo de 20,80% sob -1.1 MPa (Figura 8D).

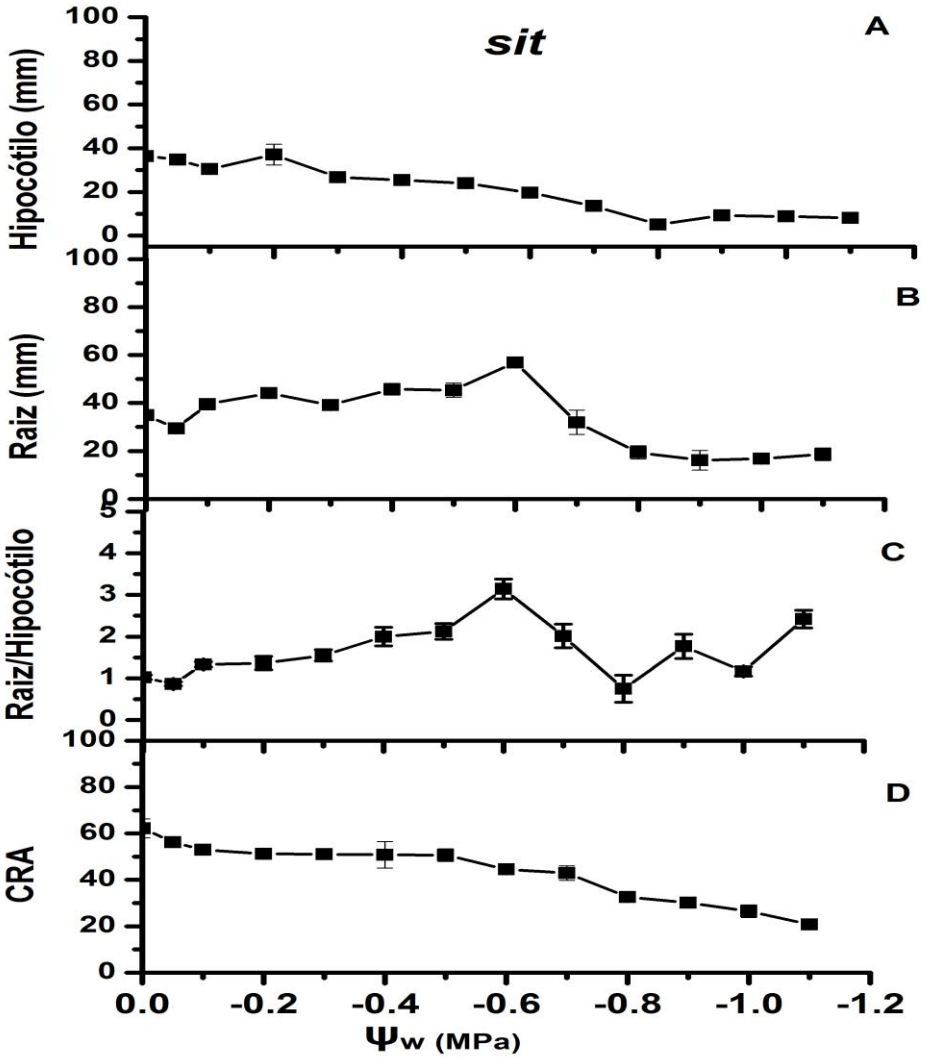

Figura 8 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *sitiens* (*sit*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

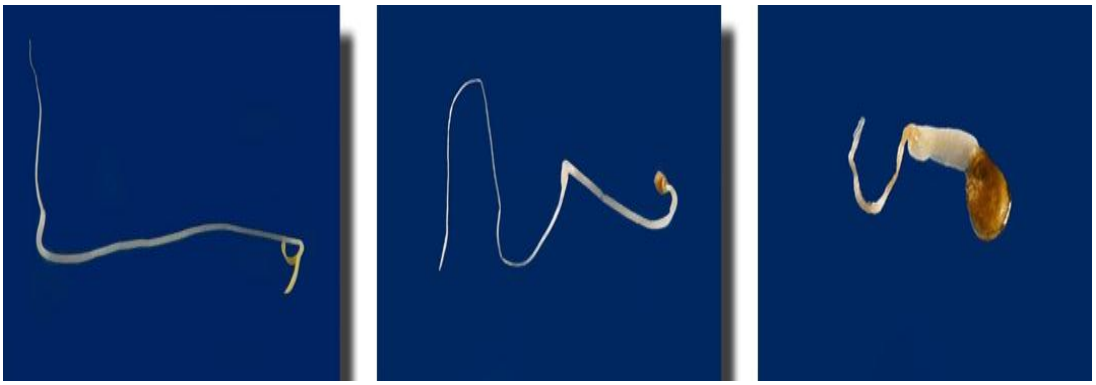

Figura 9 – Efeito do estresse osmótico no crescimento da raiz e hipocótilo de *sitiens* (*sit*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa - observar entumescimento

2.3.2.3 Plântulas de *Never ripe* (*Nr*): genótipo insensível ao etileno

Em relação às plântulas de *Nr*, o comprimento do hipocótilo foi de 37,57 mm em água. Estes valores foram decrescendo à medida que reduzia o potencial osmótico, atingindo o valor de 15,75 mm de comprimento sob -1.1 MPa (Figura 10A).

O comprimento da raiz de *Nr* em água foi de 42,11 mm. A partir de -0.2 MPa o comprimento da raiz decresceu de forma continua, atingindo o valor mínimo de 15,17 mm sob -1.1 MPa (Figura 10B e 11A, 11B e 11C).

O valor para razão raiz/hipocótilo em água foi de 1,18, atingindo um máximo de 2,47 sob -0.8 MPa. Os valores raiz/hipocótilo caíam continuamente até o valor mínimo de 0,58 sob -1.1 MPa (Figura 10C).

O conteúdo relativo de água (CRA) apresentou o valor de 69% em água, decrescendo com a redução do potencial osmótico, atingido um valor mínimo de 37,28% sob -1.1 MPa (10D).

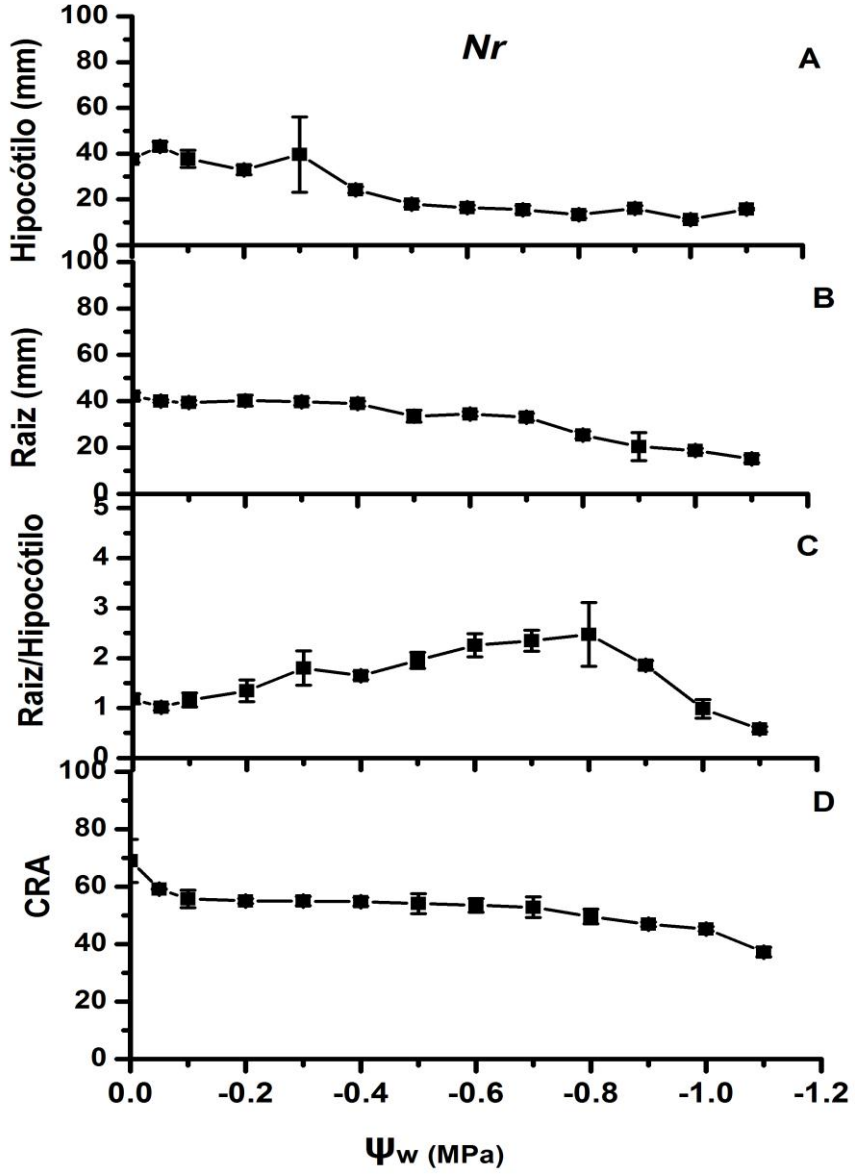

Figura 10 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *Never ripe* (*Nr*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; D - Conteúdo Relativo de Água (CRA); Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

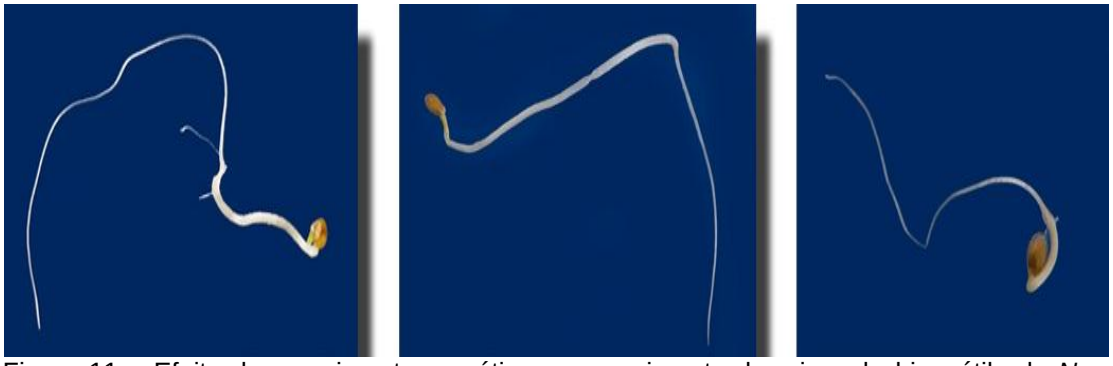

Figura 11 – Efeito do crescimento osmótico no crescimento da raiz e do hipocótilo de *Never ripe* (*Nr*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa

2.3.2.4 Plântulas do duplo mutante *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*)

No duplo mutante *Nr/sit*, o comprimento do hipocótilo foi de 34,38 mm em água. Estes valores diminuíram continuamente com a redução dos potencias osmóticos, atingindo o valor de 8,25 mm de comprimento sob potencial osmótico de -1.1 MPa, (Figura 12 A).

O comprimento da raiz de *Nr/sit* em água foi de 37,37 mm (Figuras 12B e 13A). Uma queda para 29,16 mm de comprimento raiz é observada sob - 0.05 MPa. O comprimento da raiz foi de 31,25 mm sob -0.1 MPa, atingiu um pico de 38,80 mm no potencial osmótico de -0.6 MPa (Figura 13B), um crescimento ligeiramente maior que o valor em água. A partir de -0.7 MPa, o crescimento da raiz decresceu de forma continua, atingindo o valor de 6,32 mm em -1.1 MPa (Figura 13C).

Os valores para razão raiz/hipocótilo aumentaram de forma linear até -0.6 MPa, iniciando com 1,16 em água e atingindo o valor máximo de 2,38 sob -0.6 MPa. Em concordância com os dados observados para os valores de comprimento da raiz, os valores raiz/hipocótilo caíram continuamente até o valor de 0,82 sob -1.1 MPa (Figura 12C).

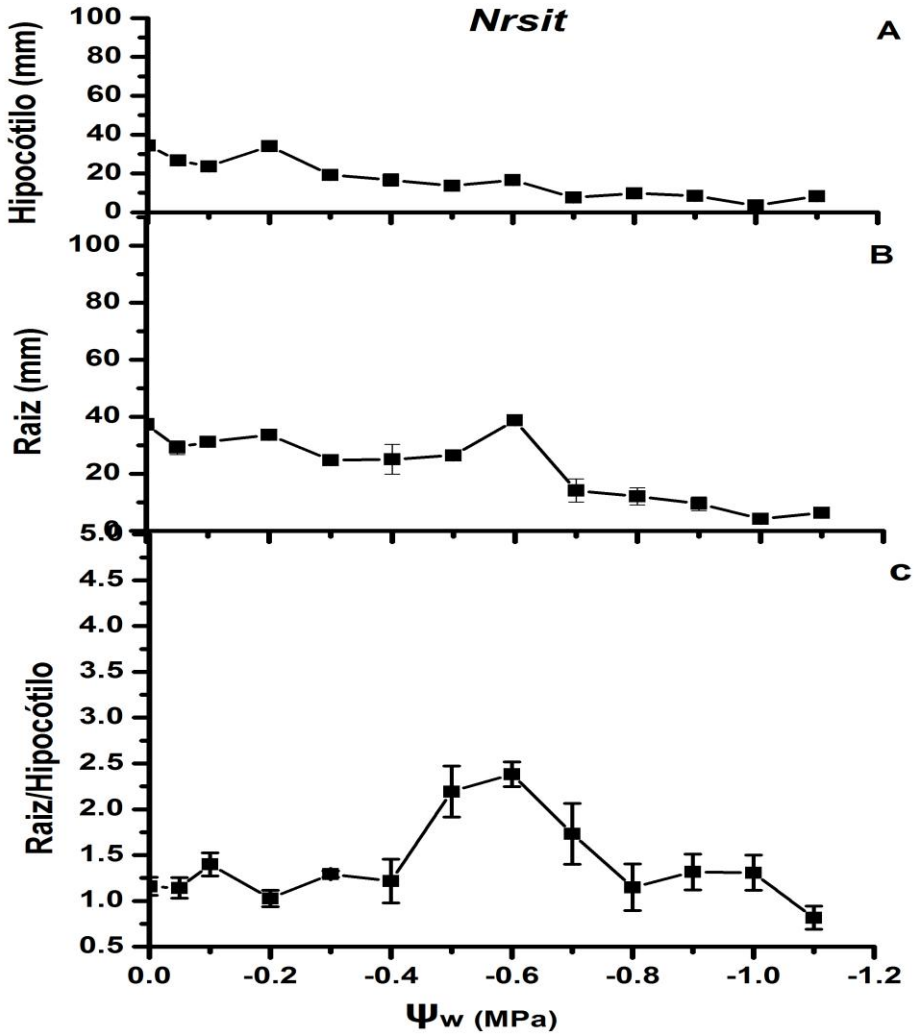

Figura 12 - Efeito de estresse osmótico em plântulas *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*). A) Comprimento do hipocótilo; B) Comprimento de raiz; C) Razão raiz/hipocótilo; Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

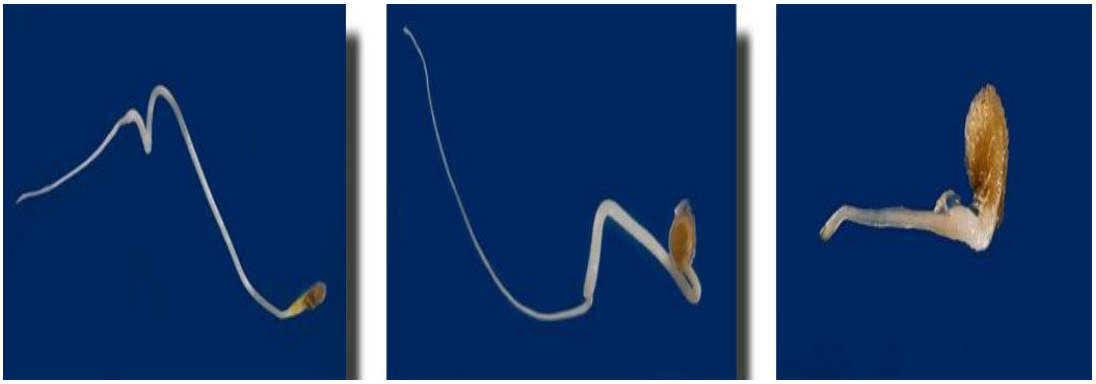

Figura 13 – Efeito do estresse osmótico no crescimento da raiz e do hipocótilo de *Never ripe/sitiens* (*Nr/sit*). A) Água; B) -0.6 MPa; C) -1.1 MPa

2.3.3 Efeito da adição de Ethrel

Para testar o efeito do etileno, foi aplicado Ethrel, uma substância liberadora deste hormônio, nas raízes de MT, *sit* e *Nr*. Desse modo, considerando-se MT como controle, observou-se um crescimento radicular de 27,81 mm em 0 µM para 30,02 mm sob concentração de 0,05 µM Ethrel em água (Figuras 14A e 14B). O comprimento da raiz volta a cair gradativamente até atingir um valor mínimo de 16,40 mm para concentração de 10 µM Ethrel em água. Em PEG 6000, houve uma redução significativa de 39,47 mm sob 0 µM para 4,37 mm sob 1 µM Ethrel aumentando para o valor 26,28 mm sob 5 µM Ethrel e voltando a diminuir ligeiramente para 21,59 mm sob 10 µM.

Para *Nr,* em água, houve um crescimento gradativo da raiz de 23,37 mm sob 0 µM para 37,03 mm sob 0,1 µM o qual foi continuo até atingir um valor de 28,51 mm de comprimento sob 10 µM. Em solução PEG 6000 (-0.6 MPa), o *Nr* decresce linearmente de 45, 85 mm sob 0 µM para um valor mínimo de 27,27 mm sob 10 µM.

As raízes do mutante *sit* em 0 µM atingiram 33,57 mm de comprimento. O comprimento caiu continuamente até atingir o valor mínimo de 10,25 mm sob concentração de 10 µM (Figuras 14A e 14B). Em PEG 6000 (-0.6 MPa), sob 0 µM, o comprimento da raiz teve um valor de 34,72 mm o qual diminui para 25,52 mm em concentração de 1 µM e mantêm-se constante até 5 µM com um valor de 22,98 mm e decresce significativamente para um mínimo de 4,00 mm sob 10 µM.

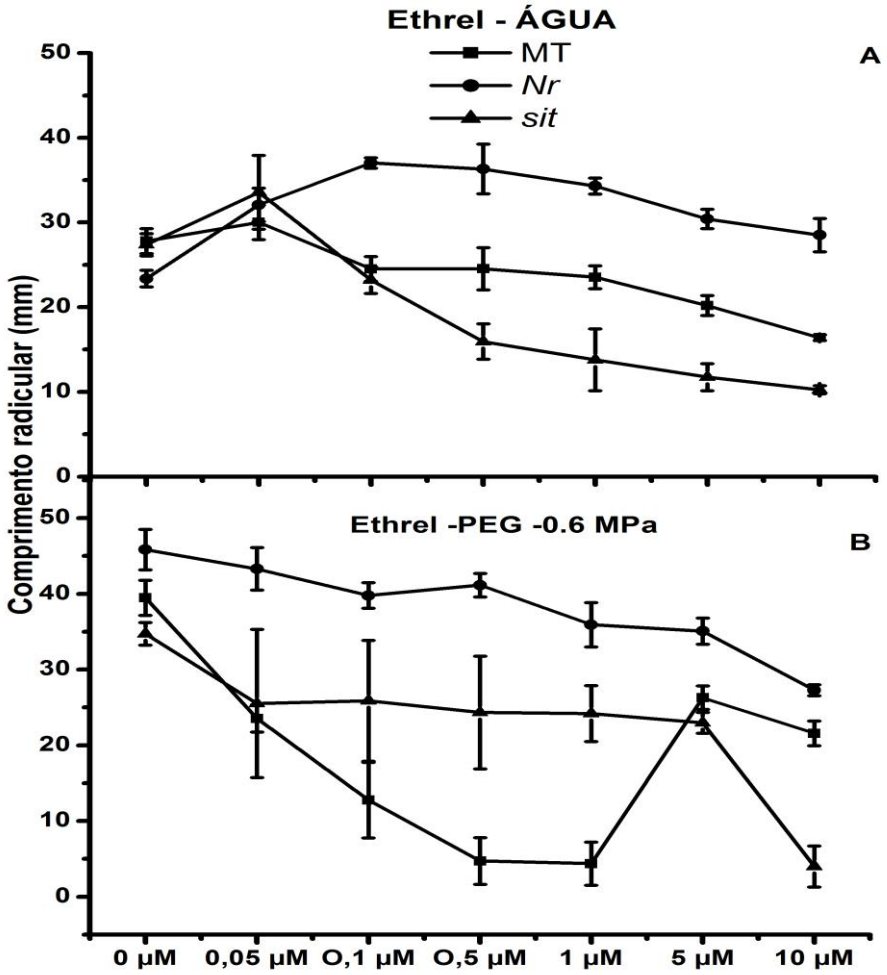

Figura 14 - Efeito da aplicação de etileno no comprimento das raízes em MT e nos mutantes *Nr* e *sit.* A) Água; B) – 0.6 MPa. Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

2.3.4 Efeito da ação do inibidor do etileno (AVG)

O efeito da inibição da produção de etileno no crescimento radicular em condições de estresse osmótico foi avaliado através de um inibidor da síntese deste hormônio, o AVG (Figura 15 A e 15B). Pode-se observar que em MT, houve um crescimento radicular de 27,15 mm sob 0 µM para 34,51 mm sob 0,1 µM em água. O comprimento diminuiu gradualmente até atingir um valor mínimo de 17,98 mm sob 10 µM (Figura 15 A e 15B).

Para *sit,* em água houve um crescimento radicular linear de 28,03 mm sob 0 µM para um máximo de 39,39 mm sob 5 µM, depois este valor cai para um mínimo de 21,47 sob 10 µM. Em PEG 6000 o comprimento da raiz foi de 30,68 mm sob uma concentração de 0 µM, aumentando para 39,48 mm sob 0,1 µM, diminuindo a seguir até atingir um valor mínimo de 24 mm sob concentração de 10 µM (Figura 15 A e 15B).

No mutante *Nr* observou-se um comportamento semelhante ao mutante *sit*. Em água houve um crescimento linear da raiz de 28,73 mm sob 0 µM para um máximo de 32, 64 mm sob 10 µM. O comprimento radicular diminui para um mínimo de 22, 20 mm sob 10 µM. Em estresse moderado (-0.6 MPa), o comprimento aumenta de 49,19 mm sob uma concentração de 0 µM para 49,68 mm sob 0,1 µM, diminuindo até atingir um comprimento mínimo de 18,22 mm sob concentração de 10 µM (Figura 15 A e 15B).

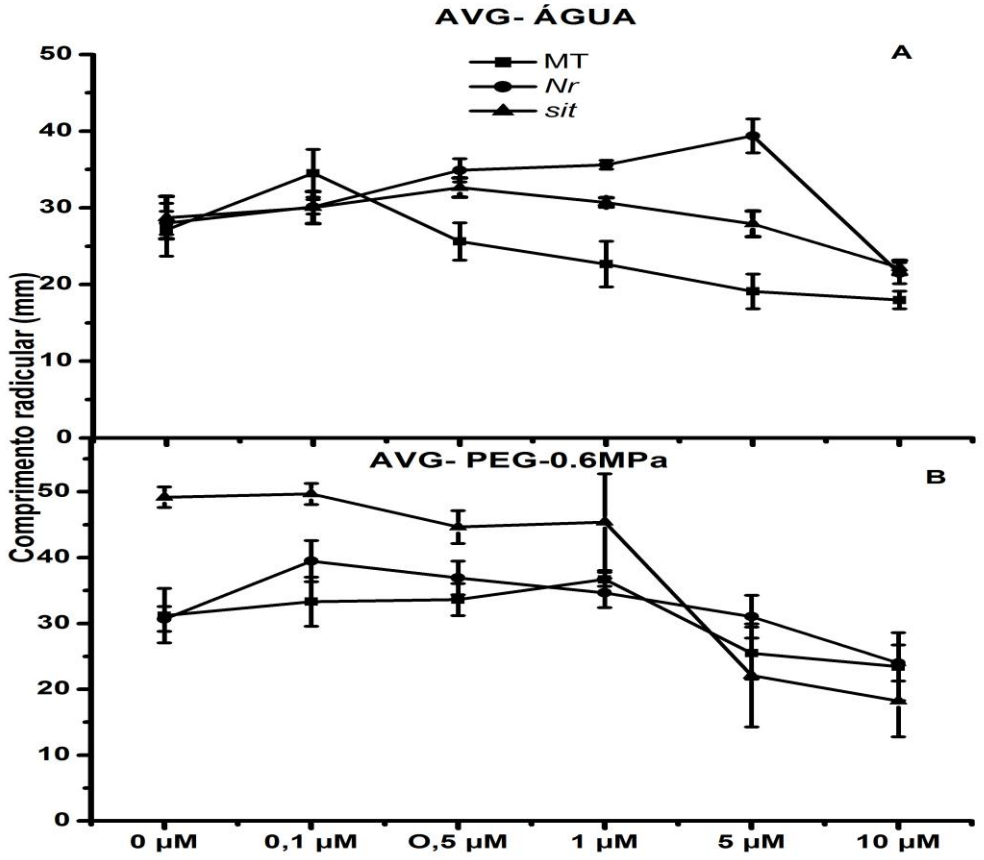

Figura 15 – Efeito da inibição da síntese do etileno no comprimento das raízes de MT e dos mutantes *Nr* e *sit.* A) Água; B) – 0.6 MPa. Barras verticais representam o erro padrão da média (n =20)

2.4 Discussão

A obtenção dos duplos mutantes *dgt/epi, epi/sit*, *Nr/sit*, *dgt/Nr* e *dgt/sit* aqui relatados é a primeira do seu tipo, pois na literatura existente não se encontram trabalhos onde se tenha realizado a obtenção dos tais duplos mutantes hormonais. Os duplos mutantes foram produzidos com objetivo de avaliar a influência dos principais hormônios relacionados ao processo de desenvolvimento da raiz em condições de estresse hídrico.

Os mutantes utilizados no cruzamento apresentam deficiência na sensibilidade de uma classe hormonal como os mutantes *dgt* (auxinas) e *Nr* (etileno); deficiência na síntese de como ocorre com *sit* (ABA); ou superprodução, em *epi* (etileno).

Os papéis fisiológicos da auxina no desenvolvimento radicular foram bem evidentes no mutante *dgt* e nos duplos mutantes *dgt/sit*, *dgt/epi* e *dgt/Nr*. O mutante *dgt* é defectivo para uma proteína ciclofilina (OH et al., 2006) responsável por uma via não canônica de sinalização das auxinas. Como esperado, esse mutante, assim como os duplos mutantes *dgt/sit, dgt/epi* e *dgt/Nr,* apresentaram raízes curtas e plagiotrópicas, crescendo de forma superficial e aparentes sobre o solo.

A auxina é necessária em pequenas concentrações, na ordem de 10^{-10} a 10^{-9} M, para promover o crescimento radicular (TAIZ; ZEIGER, 2006). Além disso, as respostas plagiotrópicas do sistema radicular são mediadas pelo AIA, na região da coifa (TAIZ; ZEIGER, 2006).

É notável que a percepção plagiotrópicas das raízes seja uma resposta independente da interação com os hormônios ABA e etileno, uma vez que essa característica não foi modificada pelas interações *dgt* e os mutantes *sit*, *epi* e *Nr.* Uma característica aditiva às raízes curtas e plagiotrópicas foi observada no duplo mutante *dgt/epi*, pelo engrossamento das mesmas.

Outra característica observada no duplo mutante *dgt/sit* não dependente da interação ABA-auxina foi a coloração verde escura do fruto antes da maturação, herdada de *sit*.

Como o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento das raízes em condições de estresse hídrico, o mutante *dgt*, bem como seus duplos *dgt/sit*, *dgt/epi* e *dgt/Nr* não

foram submetidos ao teste de estresse hídrico moderado (-0.6 MPa), por apresentarem, na caraterização dos duplos, raízes muito curtas.

Outra possibilidade para estudar o efeito de auxinas sobre o desenvolvimento radicular seria utilizar o mutante *entire* (*e*), o qual possui o gene *AUX/IAA9* mutado, apresentando um aumento na resposta a auxinas (ZHANG, et al.,2007). O transgênico *DR5::GUS*, o qual apresenta um promotor sintético baseado com elementos de resposta a auxina fusionados a proteína *β*- glucuronidase (ULMASOV et al., 1997), também pode vir a ser utilizado em pesquisas futuras que tenham o mesmo objetivo do presente estudo.

O ABA é responsável pelo fechamento estomático sob condições de estresse hídrico. Sob essas condições, o ABA também promove o crescimento radicular e inibe o desenvolvimento caulinar, aumentando a razão raiz/caule quando comparada a condições de ampla disponibilidade de hídrica (TAIZ; ZEIGER, 2006)

Spollen (2000), observou que sob condições de estresse hídrico, plântulas deficientes em ABA apresentavam maior produção de etileno e esse efeito foi completamente revertido quando o conteúdo do ABA foi restaurado através da aplicação exógena, juntamente com a retomada do crescimento radicular.

O mutante *sit* é deficiente na síntese do hormônio ABA, devido a uma mutação no gene que codifica ABA-aldeído oxidase, produzindo uma enzima defectiva (TAYLOR et al., 2000). Consequentemente, a quantidade de ABA neste mutante é reduzida. O mutante *sit*, assim como seus duplos *dgt/sit* e *Nr/sit*, apresentou fenótipos de folhas murchas e queimadas, em função da perda excessiva de água, pelos estômatos. A percepção defectiva de auxina ou de etileno, em *dgt/sit* e *Nr/sit*, respectivamente, não alterou a resposta de fechamento estomático nesses mutantes. No entanto, a superprodução de etileno ocasionada pela mutação *epi* parece ser capaz de suprir o murchamento que seria herdado de *sit*. Isso é intrigante e futuros estudos devem ser realizados para elucidar essa interação.

A interação entre ABA e etileno sob condições de estresse hídrico é de grande importância no desenvolvimento das raízes. Como há disponibilidade de duas classes de mutações antagônicas para o hormônio etileno, *Nr* e *epi* ambas foram utilizadas no presente trabalho.

Na maioria dos trabalhos publicados, o etileno é citado como inibidor do crescimento radicular. Além de formação do gancho pulmonar, ele proporcionou efeitos inibitórios no crescimento da raiz (TAIZ; ZEIGER, 2006).

O mutante *Nr* é insensível ao etileno, devido a uma mutação dominante em um dos receptores deste hormônio, impendido que se ligue ao receptor (WILKINSON et al., 1995). Como consequência, seus duplos mutantes, *dgt/Nr* e *Nr/sit* apresentaram frutos que não amadurecem completamente. Sendo o etileno responsável pelo amadurecimento de frutos de espécies climatéricas, como o tomateiro, todos esses genótipos apresentam frutos amarelos.

O mutante *epi* é superprodutor de etileno, apresentando folhas epinásticas e de coloração verde escuro. Os duplos mutantes *dgt/epi* e *sit/epi* mantiveram esse fenótipo apresentando folhas com epinastia e coloração foliar mais intensa. Além disso, os frutos dos duplos mutantes *dgt/epi* e *sit/epi* apresentaram protuberância na região estilar. Por não se conhecer a base genética e molecular responsável pela mutação *epi*, no decorrer deste estudo, optou-se por não utilizar esse mutante e os duplos *dgt/epi* e *sit/epi* nos experimentos com estresse hídrico. Um substituto do *epi* para futuros trabalhos para estresse osmótico seria o transgênico *ERE::GUS*, o qual apresenta um promotor sintético com resposta a etileno fusionado com a proteína *β*-glucaronidase (MAZAREI et al., 2008).

Ao submeter às plântulas de MT, *sit, Nr* e *Nr/sit* a diferentes potenciais osmóticos, pôde-se observar que baixos potenciais inibem mais o crescimento do caule que da raiz. Esse fato pode ser uma característica importante da resposta do sistema radicular ao estresse hídrico. Desse modo, algumas raízes possuem a capacidade de dar continuidade ao alongamento em potenciais hídricos baixos o suficiente para inibir completamente o crescimento da parte aérea.

Sharp e Davies (1985) estudaram esse processo em raízes adventícias de milho, que precisavam penetrar na camada seca da superfície do solo, e verificaram maior crescimento de raízes primárias sob condições de estresse hídrico, o que proporcionava o estabelecimento das plântulas, uma vez que assegurava o suprimento de água antes da emergência da parte aérea.

No presente estudo, verificou-se que, em geral, quanto menor potencial osmótico, menor é o comprimento da raiz. Entretanto, potencial osmótico considerado moderado (-0.6 MPa), favoreceu o crescimento de raiz e principalmente a relação raiz/hipocótilo nos genótipos MT, mutante *sit* e o duplo mutante *Nr/sit* . Isto corrobora trabalhos realizados por Peres, Zsögön e Kerbauy (2009), envolvendo a incubação das raízes de uma espécie de orquídea em meio de cultura com diferentes potenciais de água, os quais verificaram que raízes submetidas a um estresse hídrico moderado cresceram mais do que aquelas submetidas a um potencial de água mais altos. Esse fenômeno também foi observado por Sharp (2002) em diferentes espécies de grande importância agronômica, as quais apresentavam raízes primárias que mantinham taxas de alongamento considerável em água com potencial de -1 a -6 MPa, enquanto o crescimento da parte aérea fica completamente inibida em -8 MPa.

No caso de *Nr*, embora o crescimento no estresse osmótico moderado (-0.6 MPa) não tenha prejudicado o crescimento das raízes, foi muito inferior ao controle água.

Como *sit* apresenta baixo nível endógeno de ABA, sugere-se que o ABA seja necessário para o crescimento radicular sob condições estresse hídrico, conforme já proposto por Sharp e colaboradores (2004). Contudo, esses estudos foram avaliados em potenciais extremos de -0.03 à -1.6 MPa, diferentemente dos utilizados neste trabalho onde foram usados potencias mais altos de 0 a -1.1 MPa e dotados de intervalos menores entre eles. Nota-se que o ABA seja necessário para o crescimento de raiz em estresse severo -1.6 MPa, contudo em condições de estresse osmótico moderado (-0.6 MPa), a ausência de ABA pode ter favorecido o crescimento radicular em controle MT e em *sit* e no duplo *Nr/sit*. Os resultados de *sit* em -1.1 MPa sugerem que uma função importante do ABA endógeno na manutenção do crescimento da raiz primária em baixo potencial hídrico deve ser prevenir a produção excessiva de etileno. Observou-se que raízes de *sit* em baixo potencial hídrico não só são mais curtas como também apresentaram visível inchaço radial. No duplo mutante *Nr/sit* tal entumescimento foi bem menos pronunciado, reforçando a hipótese de que é dependente de etileno.

O mutante *Nr* é insensível ao etileno e ao comparar seu crescimento em água com os demais potencias e com os outros genótipos, o crescimento foi maior em *Nr* em água, podendo-se inferir que o etileno é um dos principais inibidores de crescimento radicular.

Através dos resultados acima apresentados e corroborando com Peres, Zsögön e Kerbauy (2009) pode-se concluir que o acúmulo de ABA é necessário para que a raiz cresça em condições de estresse osmótico atuando como inibidor de etileno, mas que também parece ser necessário o acúmulo de auxina para o crescimento radicular. Como ABA e auxina possuem efeitos contrários no “status” do etileno endógeno, essa hipótese de crescimento radicular pode ser controlada por um balanço ABA/IAA endógeno. Tal hipótese poderá ser testada no futuro usando os novos genótipos disponíveis com alterações em auxina, como DR5::GUS e *entire*.

.

3 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir:

Durante a imposição do estresse osmótico, ocorreram variações dos parâmetros do crescimento radicular de forma mais suave durante o estresse moderado (-0.6 MPa), onde observou-se maior crescimento das raízes. Contudo, em baixos potencias o crescimento reduziu drasticamente. Observou-se também que o hipocótilo é mais inibido que a raiz durante a imposição do estresse. Tal fato sugere que em condições de estresse hídrico moderado, as plantas podem lançar mão desse mecanismo para modular o crescimento relativo entre raiz e parte aérea. Os resultados com os mutantes *sit* e *Nr*, sugerem que ABA e etileno podem mediar esse mecanismo modulatório, embora mais estudos são necessários.

Os experimentos com aplicação exógena do liberador de etileno e a do inibidor de síntese de etileno contribuíram pouco para o entendimento do processo, o que pode estar refletindo as limitações intrínsecas dos tratamentos exógenos, os quais tendem a ter menor efeito fisiológico devido às doses farmacológicas.

Os duplos mutantes produzidos neste trabalho poderão ser usados para futuras pesquisas envolvendo interações hormonais em outros eventos do desenvolvimento e resposta a fatores bióticos e abióticos.

REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.J. **Ethylene in plant biology.** 2nd ed. New York: Academic Press, 1992. v. 1, 654 p.

ADAMS, D.O.; YANG, S.F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 76, p.170-174, 1979.

ANDERSON, J.M.; FRANCESCHINI, V.R.; KLAUER, S.F.; SPILATRO, S.R. Jasmonic acid dependent increase in the level of vegetative storage protein in soybean. **Plant Science**, Kidlington, v. 62, p. 45-52, 1989.

AZPIROZ, R.; WU, Y.; LOCASCIO, J.C.; FELDMANN, K.A. An *Arabidopsis* brassinosteroid dependent mutant is blocked in cell elongation. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 219-30, 1998.

BACON, M.A.; WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. pH-regulated leaf cell expansion in droughted plants is abscisic acid dependent. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 1507-1515, 1998.

BARRY, C.S.; LLOP-TOUS, M.I.; GRIERSON, D. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 979-986, 2000.

BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D.; MULLEN, R.T. *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. 585-93, 2008.

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

BRADFORD, K.J. Water relations and growth of the *flacca* tomato mutant in relation to abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 251-255, 1983.

BRICKELL, C.D.; BAUM, B.R.; HETTERSCHEID, W.L.A.; LESLIE, A.C.; MCNEILL, J.; TREHANE, P.; VRUGTMAN, F.; WIERSEMA, J.H. International code of nomenclature of cultivated plants. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 647, p. 1-123, 2004.

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

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; TAYLOR, T. Structure and expression of a cDNA encoding a putative neoxanthin cleavage enzyme (NCE), isolated from a wilt-related tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) library. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 317, p. 2111–2112, 1997.

CAMPOS, M.L.; DE ALMEIDA, M.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; LITHOLDO, J.C.G.; FIGUEIRA, A.; RAMPELOTTI-FERREIRA, F.T.; VENDRAMIM, J.D.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Brassinosteroids interact negatively with jasmonates in the formation of anti-herbivory traits in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 4347-4361, 2009.

CARVALHO, R.F. **Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento**. 2008. 107 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CHERIAN, S.; REDDY, M.P.; FERREIRA, R.B. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, p. 481-495, 2006.

CLOUSE, S.D.; SASSE, J.M. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 427-451, 1998.

COENEN, C.; BIERFREUND, N.; LÜTHEN, H.; NEUHAUS, G. Developmental regulation of H^+-ATPase-depedent auxin responses in the *diageotropica* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagem, v. 114, p. 461-471, 2002.

COHEN, J.D.; BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of the bound auxins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 33, p. 403-430, 1982.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteroides, poliaminas, acido jasmonico e salicilico. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia vegetal.** [s.l.: s.n.], 2004. p. 333-340.

CHRISTIAN, M.; LÜTHEN, H. New methods to analyse auxin-induced growth In: Classical auxinology goes *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, New York, v.32, p. 107-114, 2000.

CHRISTIAN, M.; STEFFENS, B.; SCHENCK, D.; LÜTHEN, H. The *diageotropica* mutation of tomato disrupts a signaling chain using extracellular auxin binding protein 1 as a receptor. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 309-314, 2003.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 92, p. 4114–4119, 1995.

CUSHMAN, J.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 117-124, 2000.

DAVIES, P.J. The plant hormones concept: concentration, sensitivy, and transport. In: _____. (Ed.). **Plant hormones:** physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 13-38.

DANIEL, S.G.; RAYLE, D.L.; CLELAND, R.E. Auxin physiology of the tomato mutant *diageotropica*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 804-807, 1989.

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

FANTI, S.C.; PEREZ, S.C.J.G.A. Processo germinativo de sementes de painera sob estresse hídrico e salino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 903-909, 2004.

FREY, A.; AUDRAN, C.; MARIN, E.; SOTTA, B.; MARION-POLL, A. Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 1267-1274, 1999.

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.

GEWIN, V. Food: an underground revolution. **Nature**, London, v. 466, p. 552–553, 2010.

GHASSEMIAN, M.; NAMBARA, E.; CUTLER, S.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; MCCOURT, P. Regulation of abscisic acid signalling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 112, p. 1117-1126, 2000.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.B.; PUECH-PAGES, V.; DUN, EA; PILLOT, J.P.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.C.; BOUWMEESTER, H.; BECARD, G.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.F. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, London, v. 455, p. 189-194, 2008.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam v. 67, p. 387-394, 2009.

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

GREGORY, L.E.; MANDAVA, N.B. The activity and interaction of brassinolide and gibberellic acid in mung bean epicotyls. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 23, p. 1275 -1281, 1982.

HANSEN, H.; GROSSMAN, K. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1437-1448, 2000.

HARTUNG, W.; RADIN, J.W.; HENDRIX, D.L. Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH. **Plant Physiology**, Rockville, v. 86, p. 908–913, 1988.

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

JONES, H.G.; JONES, M.B. Introduction some terminology and common mechanisms. In: JONES, H.G.; FLOWERS, T.J.M.; JONES, B. (Ed.). **Plants under stress**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p. 181-196.

JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E.; ZITTER, T.A. **Compendium of tomato diseases.** St. Paul: APS Press, 1991. 73 p.

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

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

KIEBER, J.; ROTHENBERG, M.; ROMAN, G.; FELDMANN, K.; ECKER, J. *CTR7*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. **Cell**, Pennsylvania, v. 72, p. 427-441, 1993.

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.

KOLTAI, H.; LEKKALA, S.P.; BAHATTACHARYA, C.; MAYZLISH-GAT, I.E.; RESNICK, N.; WININGER, S.; DOR, E.; YONEYAMA, K.; HERSHENHORN, J.; JOEL D.M.; KAPULNIK, Y. A Tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, p. 1739 -1749, 2010.

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

KRISHNA, P. Brassinosteroid-mediated stress responses. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 289 -297, 2003.

LANAHAN, M.B.; YEN, H.C.; GIOVANNONI, J.J.; KLEE, H.J. The *Never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 521–530, 1994.

LASHBROOK, C.C.; TIEMAN, D.M.; KLEE, H.J. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. **The Plant Journal**, Oxford, v.15, p. 243-252, 1998.

LENOBLE, M.E.; SPOLLEN, W.G.; SHARP, R.E. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 237-245, 2004.

LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Callus, shoot and hairy root formation in vitro as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 28, p. 1169-1177, 2009.

LIN, Z; HACKETT, R.M.; PAYTON, S.; GRIERSON, D. A tomato sequence (AJ005077) encoding an *Arabidopsis CTR1* homologue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 1125, 1998.

LJUNG, K.; HULL, A.K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J.D.; SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 309-332, 2002.

MADLUNG, A.; BEHRINGER, F.J.; LOMAX, T.L. Ethylene plays multiple nonprimary roles in modulating the gravitropic response in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 897-906, 1999.

MANDAVA, N.B. Plant growth-promoting brassinosteroids. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 23-52, 1988.

MAZAREI, M.; TEPLOVA, I.; HAJIMORAD, M.R.; STEWART, C.N. Pathogen Phytosensing: plants to report plant pathogens. In: SENSORS, NANOTECH CONFERENCE, 8., 2008, Anaheim. **Phytosensors:** environmental sensing with plants and plant cells; proceedings… Anaheim, 2008. p. 2628-2641.

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

MITO, N.; BENNETT, A.B. The *diageotropica* mutation and synthetic auxins differentially affects the expression of auxin-regulated genes in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 293-297, 1995.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinins: chemistry, activity and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 15-35, 2001.

MONTOYA, T.; NOMURA, T.; FARRAR, K.; KANETA, T.; YOKOTA, T.; BISHOP, G.J. Cloning the tomato curl 3 gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 3163-3176, 2002.

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

MURILLO-AMADOR, B.; LOPEZ-AGUILAR, R.; KAYA, C.; LARRINAGAMAYORAL, J.; FLORES-HERNANDEZ, A. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Oxford, v. 188, p. 235-247, 2002.

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

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

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.

ONO, E.O.; TERUKO, N.; MACHADO, S.R.; RODRIGUES, J.D. Application of brassinosteroid to *Tabebuia alba* (Bignoniaceae) plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 187-194, 2000.

PERALTA, I.E.; KNAPP, S.; SPOONER, D.M. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Report on Tomato Genetics Cooperative**, New York, v. 56, p. 6-12, 2006.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro.* **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 1-5, 2002.

PERES, L.E.P.; ZSÖGÖN, A.; KERBAUY, G.B. Abscisic acid and auxin accumulation in *Catasetum fimbriatum* roots growing *in vitro* with high sucrose and mannitol content. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 53, p. 560-564, 2009.

PERES, L.E.P.; CARVALHO, R.F.; PINO-NUNES, L.E.; LIMA, J.E.; PIOTO, F.A. A collection of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) mutants useful to study the multiple hormonal control of plant development. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT GROWTH SUBSTANCES, 18, 2004, Canberra. **Proceedings…** Canberra, 2004. p. 1.

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.

_____. **Controle do desenvolvimento pela interação auxina-citocinina**: uma nova abordagem baseada no uso de mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). 2009. 140 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; KELMENSON, P.M.; LAZAROVA, G.I.; KUBOTA, T.; ALBA, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant Cell, and Environment**, Oxford, v. 20, p. 672-677, 1997.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 902 p.

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

RICE, M.S.; LOMAX, T.L. The auxin-resistant *diageotropica* mutant of tomato responds to gravity via an auxin-mediated pathway. **Planta**, Berlin, v. 210, p. 906-913, 2000.

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

RIOV, J.; DAGAN, E.; GOREN, R.; YANG, S.F. Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, p. 48-55, 1990.

ROSADO, A.; AMAYA, I.; VALPUESTA, V.; CUARTERO, J.; BOTELLA, M.A.; BORSANI, O. ABA and ethylene-mediated responses in osmotically stressed tomato are regulated by the TSS2 and TOS1 loci. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 3327-3335, 2006.

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

SCHWARTZ, S.H.; QIN, X.; ZEEVAART, J.A.D. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p.1591-1601, 2003.

SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. The biochemistry and the physiological and molecular actions the jasmonates. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 44, p. 569-589, 1993.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-131, 1957.

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

SHARP, R.E.; DAVIES, W.J. Root growth and water uptake by maize plants in drying soil. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, p. 1441-1456, 1985.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E. ABA ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 33-37, 2002.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1575-1584, 2000.

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

SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes *Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. **Táxon**, Wien, v. 54, p. 43-61, 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. p. 34-109.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 705 p.

TANKSLEY, S. Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*) (2N=24). In: O'BRIEN, J. (Ed.). **Genetic maps:** locus maps of complex genomes. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1993. p. 639 -660.

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

TREWAVAS, A.J.; JONES, H.G. An assessment of the role of ABA in plant development. In: DAVIES, W.J.; JONES, H.G. (Ed.). **Abscisic acid:** physiology and biochemistry. Oxford: Bios Scientific, 1991. p. 169-188.

ULMASOV, T.; MURFETT, J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. AUX/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1963-1971, 1997.

UMEHARA, M.; HANADA, A.; YOSHIDA, S.; AKIYAMA, K.; ARITE, T.; TAKEDA - KAMIYA, N.; MAGOME, H.; KAMIYA, Y.; SHIRASU, K.; YONEYAMA, K.; KYOZUKA, J.; YAMAGUCHI, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. **Nature**, London, v. 455, p. 195-200, 2008.

VAN STADEN, J.; SMITH, A.R. The synthesis of cytokinins in excised roots of maize and tomato under aseptic conditions. **Annals of Botany**, Oxford, v. 42, p. 751-753, 1978.

VILLELA, F.A.; DONI-FILHO, L.; SEQUEIRA, E.L. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 1957-1968, 1991.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHÉ, A.; PECH, J.; 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.

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

XU, Q.; XU, X; ZHAO, Y; JIAO, K; HERBERT, S.J.; HAO, L. Salicylic acid-altering *Arabidopsis* mutants response to NO_2 exposure. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 84, p.106 -111, 2009.

YANG, S.F. The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In: THOMPSON, W.W.; NOTHAGEL, E.; HUFFAKE, R. (Ed.). **Plant senescence:** its biochemistry and physiology. Rockville: The American Society of Plant Physiologists, 1987. p. 156-165.

ZEEVAART J.A.D. Abscisic acid metabolism and its regulation. **Science**, New York, v. 134, p. 189 -207, 1999.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MARTY, C.; MAITRE, B.; LATCHE, A.; PECH, J.C; BOUZAYEN, M. Ethylen: regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene- responsive and ripening- related genes isolated by differential display. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 589-600, 1999.

ZHANG, J.; CHEN, R.; XIAO, J.; QIAN, C.; WANG, T.; LI, H.; OUYANG, B.; YE, Z.A. Single-base deletion mutation in SlIAA9 gene causes tomato (*Solanum lycopersicum*) *entire* mutant. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 120, p. 671-678, 2007.

ZHANG, K.; LETHAM, D.S.; JOHN, P.C.L. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 2-12,1996

ZOBEL, R.W. Some physiological characteristics of the ethylene-requiring tomato mutant *diageotropica*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 52, p. 385-389, 1973.

ZSÖGÖN, A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 259-267, 2008.