**USO DE MUTANTES FOTOMORFOGENÉTICOS NO ESTUDO DA
COMPETÊNCIA PARA REGENERAÇÃO *in vitro* EM MICRO-TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2003

**USO DE MUTANTES FOTOMORFOGENÉTICOS NO ESTUDO DA COMPETÊNCIA
PARA REGENERAÇÃO *in vitro* EM MICRO-TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
Biólogo

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

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2003

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

Carvalho, Rogério Falleiros

Uso de mutantes fotomorfogênicos no estudo da competência para regeneração *in vitro* em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv micro-tom) / Rogério Falleiros. - - Piracicaba, 2004.

69 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Cultura de tecido 2. Fotoperiodismo 3. Linhagem vegetal 4. Morfogênese vegetal 5. Mutação genética 6. Regeneração in vitro 7. Tomate I. Título

CDD 635.642

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

**Aos meus pais Pésio e Maria Amélia
com todo meu amor**

OFEREÇO

**Ao meu irmão Guilherme, aos meus
sobrinhos Mariana e Rafael e aos
meus avós Dié, Fina, Zito e Lála**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pela orientação, amizade, paciência e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Gallo pela utilização do Laboratório de Cultura de Tecidos e da Casa de Vegetação do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC) e pela presteza durante todo o tempo.

Ao Prof. Dr. Massanori Takaki da UNESP-Rio Claro pela disponibilidade do Laboratório de Fotomorfogênese pelo constante acompanhamento das atividades deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alfredo Kluge pela orientação no início do curso.

A secretária do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete, pela amizade e eficiência profissional.

Ao grande amigo Enio Thiago Oliveira pela prontidão e companheirismo em todas as etapas deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Murilo Melo, Ricardo Ferraz de Oliveira e Beatriz Appezzato da Glória pelas atividades à frente do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas e também pela amizade.

A estagiária do Laboratório de Cultura de Tecidos do CEBTEC, Tatiana "Tati", pela colaboração e paciência durante a minha passagem por aquele laboratório.

A técnica do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA – USP, Inês, pela receptividade e disponibilidade do laboratório.

Aos membros do Grupo de Estudo de Fisiologia, Genética e Melhoramento de Tomateiro, Lillian, Thiago Perez, Thiago Tremocoldi, Fernando, Marcos, Oscar e

ao ex-estagiário, Luiz, que através da cooperação permitiram o bom andamento de meus experimentos em casa de vegetação.

Ao também membro do Grupo de Estudo de Fisiologia, Genética e Melhoramento de Tomateiro, Jony, que muitas vezes deixou seus afazeres para auxiliar-me nas atividades de cultura de tecido *in vitro*. Valeu!

A Ana Paula Pimenta pela incessante torcida mesmo de longe.

As minhas extraordinárias amigas Amandinha e Caracol pela oportunidade de tê-las como amigas, tornando o trabalho mais gratificante.

Aos amigos do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Amaral, Adriano, Ana Helena, Daniela, Fabiana, Flavinha, Henrique, Maria Luiza, Maria Tereza, Patrícia, Paty Gaya, Paulinha, Saulo e Simone pela agradável convivência.

Aos moradores da República Blue House, CPI, Nei, Mura, Pelé, Sandal, Severino e aos ex-moradores, Denis e Ricardo, por não deixar que vida se tornasse rotina, ou seja, pelas memoráveis festas.

Aos moradores da República PNC, Kbral, Sub, Sakola, Seunomi, Urtiga e Presidente pela curta, porém inesquecível passagem por aquela casa.

A todos os alunos, professores e funcionários do Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas ESALQ-USP.

A FAPESP (proc. 01/11074-8) pelos recursos financeiros concedidos.

OBRIGADO

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Fotomorfogênese	3
2.1.1 Fitocromos	3
2.1.2 Mutantes fotomorfogenéticos	8
2.2 Micro-Tom como modelo fisiológico	14
2.3 Variação genética na capacidade de regeneração <i>in vitro</i> em tomateiro..	15
2.4 Competência para regeneração <i>in vitro</i>	17
2.5 Regeneração <i>in vitro</i> como uma resposta fotomorfogenética	18
2.6 Interação entre fotomorfogênese e hormônios	22
2.6.1 Fitocromo e etileno	22
2.6.2 Fitocromo e citocininas	22
2.6.3 Fitocromo e giberelinas	23
2.6.4 Fitocromo e auxina	24
2.6.5 Fitocromo e ácido abscísico	25
2.6.6 Fitocromo e brassinoesteróide	25
3 OBJETIVO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Material vegetal	28
4.2 Cruzamentos	30

4.3 Coleta e armazenamento de sementes	30
4.4 Seleção dos genótipos obtidos de micro-mutantes fotomorfogenéticos e micro-MsK	30
4.5 Cultivo em casa de vegetação	31
4.6 Testes para presença de mutações fotomorfogenéticas	31
4.6.1 Mutantes <i>hp</i>	31
4.6.2 Mutantes <i>fri</i> e <i>tri</i>	32
4.7 Avaliação do alongamento do hipocótilo e do entrenó do mutante micro- <i>au</i>	32
4.8 Teste da capacidade de regeneração <i>in vitro</i>	32
4.8.1 Cultivo <i>in vitro</i>	32
4.8.2 Teste de regeneração	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Obtenção de micro-mutantes fotomorfogenéticos	36
5.2 Obtenção do micro-MsK	42
5.3 Obtenção das gerações	44
5.3.1 Gerações de micro-mutantes fotomorfogenéticos	44
5.3.2 Gerações de micro-MsK	45
5.4 Teste de regeneração <i>in vitro</i>	45
5.4.1 Efeito do V e VE na regeneração de raízes de micro-MsK	46
5.4.2 Efeito das mutações fotomorfogenéticas e do locus <i>Rg1</i> na capacidade de regeneração de raízes <i>in vitro</i> sob luz branca	46
5.4.3 Efeito do V e VE na capacidade de regeneração de explantes caulinares e foliares <i>in vitro</i> do MT e micro-MsK	47
5.4.4 Efeito das mutações fotomorfogenéticas e do locus <i>Rg1</i> na capacidade de regeneração de explantes caulinares e foliares <i>in vitro</i> sob luz branca	48
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

atv = mutante *atroviolacea*

au = mutante *aurea*

B = azul

fri = mutante *far red insensitive*

Fv = forma inativa do fitocromo

Fve = forma ativa do fitocromo

hp = mutante *high pigment*

lp = mutante *Intense pigment*

LB = luz branca

MT = Micro-Tom

PHY = gene do fitocromo

PHY = apoproteína do fitocromo

phy = fitocromo

Rg1 = locus da alta capacidade de regeneração

tri = mutante *temporary red insensitive*

V = vermelho

VE = vermelho-extremo

**USO DE MUTANTES FOTOMORFOGENÉTICOS NO ESTUDO DA
COMPETÊNCIA PARA REGENERAÇÃO *in vitro* EM MICRO-TOMATEIRO
(*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

Autor: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

Orientador: Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

RESUMO

Paralelamente ao modelo *Arabidopsis thaliana*, o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) tem sido crescentemente utilizados em abordagens genéticas de questões fisiológicas. Uma das principais vantagens de *Arabidopsis* como “planta de laboratório” tem sido seu pequeno porte e ciclo de vida curto. Contudo, a cultivar Micro-Tom (MT) de tomateiro possui tamanho muito reduzido (8 cm) e pode produzir até 5 gerações por ano. Mutantes fotomorfogenéticos em tomateiro deficientes na síntese do cromóforo do fitocromo (*au*), mutantes deficientes na síntese das apoproteínas PHYA e PHYB1 (*fri* e *tri*, respectivamente) e mutantes superexpressando o fitocromo (*hp*, *atve* *lp*) constituem-se em um modelo para estudos da fotomorfogênese. No que se refere à capacidade de regeneração *in vitro* como uma resposta fotomorfogenética, poucos trabalhos têm sido realizados. O presente trabalho teve como objetivo transferir as mutações *au*, *fri*, *tri*, *hp*, *lp* e *atv*, bem como o locus de regeneração (*Rg1*) da cultivar MsK, para a cultivar Micro-Tom. As linhagens obtidas foram utilizadas para verificar o efeito da fotomorfogênese na competência para regeneração *in vitro*. Para tanto, foram realizados tratamentos com luz branca, vermelho (V) e vermelho-extremo (VE) em explantes radiculares, caulinares e foliares do genótipo micro-MsK em meio MS mais 5µM de BAP e tratamentos com luz branca em explantes radiculares, caulinares e foliares de micro-mutantes fotomorfogenéticos

também em meio MS mais 5 μ M de BAP. Para todos os tratamentos utilizou-se a cultivar MT como controle. Sob V, as raízes de micro-MsK apresentaram-se diferenciadas, enquanto sob VE não ocorreu diferenciação. O maior número de gemas formadas tanto para caule quanto para folhas de micro-MsK ocorreu sob V, enquanto sob VE foi observado um decréscimo na formação de gemas. A partir destes resultados sugere-se que a forma ativa do fitocromo, induzida pelo V, interage com o *Rg1* na aquisição de competência para regeneração. Nos tratamentos com luz branca, raízes de micro-MsK e de mutantes micro-*hp*, micro-*atv* e micro-*lp* apresentaram-se diferenciadas, enquanto não houve diferenciação para o mutante micro-*au* ou para o controle MT. O número de gemas formadas alcançou maiores valores para folhas de micro-*hp* e micro-*lp* e a para caules de micro-*atv*. Apenas um número muito reduzido de gemas foi formado a partir de folhas de micro-*au*. Com base na alta competência para regeneração de micro-MsK e de mutantes que superexpressam o fitocromo, sugere-se que o fitocromo promove, em uma via de sinalização, a indução de fatores de regeneração (*Rg1*). Alternativamente, o *locus Rg1* poderia promover a alta capacidade regenerativa tornando os explantes mais competentes ao efeito da superexpressão do fitocromo, o qual poderia induzir outros fatores de regeneração.

**USE OF PHOTOMORPHOGENIC MUTANTS IN THE STUDY OF THE
COMPETENCE FOR *in vitro* REGENERATION IN MICRO-TOMATO
(*Lycopersicon esculentum* CV MICRO-TOM)**

Author: ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO

Adviser: Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

SUMMARY

Parallel to *Arabidopsis thaliana* model, the tomato (*Lycopersicon esculentum*) has been increasingly used as a genetic approach to address physiological questions. One of the main advantages of *Arabidopsis* as a “laboratory plant” has been its small size and short life cycle. However, the tomato cultivar Micro-Tom (MT) possesses reduced size (8 cm) and can produce up to 5 generations per year. Tomato photomorphogenic mutants deficient for the synthesis of phytochrome chromophore (*au*) or the apoprotein PHYA and PHYB1 (*fri* and *tri*, respectively), as well as mutants superexpressing phytochrome (*hp*, *atv* and *lp*) consist on a model to study photomorphogenesis. Concerning the *in vitro* regeneration capacity as a photomorphogenic response, fewer works have been carried through. The current work aimed at transferring the mutations *au*, *fri*, *tri*, *hp*, *lp* and *atv*, as well as the regeneration locus (*Rg1*) of cv MsK to the cv Micro-Tom (MT). The genotypes obtained were used to verify the effect of photomorphogenesis on the competence for *in vitro* regeneration. Root, stem and leaf explants from MT and Micro-MsK were incubated in MS plus 5µM BAP under white, red (R) and far-red (FR)

light. Root, stem and leaf explants from MT and photomorphogenic micro-mutants were incubated in MS plus 5 μ M BAP under white light. Under R, roots of micro-MsK were presented differentiation, while under FR the differentiation did not occur. Under R, stem explants from micro-MsK formed more shoots than did leaf explants, while under FR was observed a decrease in shoot formation for all types of explants. These results suggest that the active form of phytochrome, induced by R, interacts with the *Rg1* in the acquisition of competence for regeneration. In the treatments with white light, roots of micro-MsK and of mutants micro-*hp*, micro-*atv* and micro-*lp* presented differentiation, while no differentiation was observed for the mutant micron-*au* or control MT. The number of shoots formed reached the highest values for leaf explants of micro-*hp* and micro-*lp* and for stem explants of micron-*atv*. Only a low number of shoots was formed from micro-*au* leaf explants. On the basis of the high competence for regeneration of micro-MsK and mutants that super express phytochrome, it is suggested that the phytochrome promotes, in a signaling pathway, the induction of regeneration factors (*Rg1*). Alternatively, the *Rg1* locus may turn the explant most competent to respond to phytochrome, which could induces others regeneration factors.

1 INTRODUÇÃO

O efeito primário da mutação é a expressão defectiva ou alterada de um gene. Deste modo, a disponibilidade de genótipos mutantes torna-os instrumentos importantíssimos para estudar os eventos fisiológicos e morfológicos que compõem a planta. A utilização extensiva de mutantes em estudos de fisiologia vegetal é relativamente recente, porém, uma rápida expansão na utilização destas ferramentas pode ser observada nos últimos anos (Kendrick & Kronenberg, 1994).

Mutantes exibindo deficiência no fitocromo em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) têm sido um modelo para estudos da fotomorfogênese. O mutante *au* (*aurea*) apresenta deficiência na síntese do cromóforo do fitocromo. Os mutantes *fri* (*far red insensitive*) e *tri* (*temporary red insensitive*) apresentam deficiência na síntese da apoproteína PHYA e PHYB1, respectivamente. Por último, a superexpressão do fitocromo pode ser encontrada nos mutantes *hp* (*high pigment*), *atv* (*atroviolacea*) e *lp* (*Intense pigment*) de tomateiro (Kendrick et al., 1994).

No que se refere à capacidade de regeneração *in vitro* como uma resposta fotomorfogenética, poucos trabalhos têm sido realizados (Lercari et al., 1999; Bertram & Lercari, 2000; Tyburski & Tretyn, 1999). Somente um reduzido número de genótipos de *Lycopersicon* possui a capacidade de regenerar novas plantas a partir de explantes radiculares (Peres et al., 2001). Koornneef et al., (1993) constataram que a capacidade de regeneração em explantes radiculares em *Lycopersicon peruvianum* é controlada por um único locus (*Rg1*), o qual foi introgridido na cv MsK.

O presente trabalho teve como proposta a criação de linhagens de tomateiro contendo as mutações *au*, *fri*, *tri*, *lp*, *hp* e *atv*, bem como o locus de regeneração *Rg1*, na cultivar Micro-Tom, a qual é uma cultivar miniatura que

produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-150ml de substrato, completando seu ciclo de vida em 70-90 dias. A cultivar Micro-Tom foi recentemente proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético.

As linhagens obtidas neste trabalho foram utilizadas para estudar o papel da fotomorfogênese nos processos de regeneração *in vitro*. A interpretação dos resultados aqui apresentados pode contribuir para uma melhor compreensão da competência para regeneração *in vitro*, bem como tornar menos empírico o desenvolvimento de protocolos para cultura de tecidos, a qual é amplamente utilizada em diversas aplicações biotecnológicas. Além disso, as linhagens mutantes aqui obtidas poderão ser muito úteis para outros estudos fisiológicos envolvendo o controle do desenvolvimento pela luz.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fotomorfogênese

Durante o ciclo de vida da planta, respostas como germinação de sementes, inibição do alongamento do hipocótilo e do caule, síntese de clorofila e antocianina, expansão foliar, floração e tuberização, estão envolvidas diretamente com a duração e qualidade da luz (Neff et al., 2000). O processo pelo qual a luz regula o desenvolvimento da planta é denominado fotomorfogênese (Kendrick & Kronenberg, 1994).

No processo fotomorfogenético há pelo menos quatro classes de fotorreceptores: fitocromos, os quais absorvem predominantemente o comprimento de onda do vermelho (V, 650-680nm) e vermelho-extremo (VE, 710-740nm), fotorreceptores que absorvem a luz azul/UV-A (320-400nm), denominados criptocromos, e fotorreceptores que absorvem o UV-B (280-320nm). Fototropinas são também fotorreceptores que absorvem luz azul (400-490) e estão envolvidos no processo de fototropismo.

2.1.1 Fitocromos

Os fotorreceptores mais estudados são os fitocromos. Estes pigmentos possuem uma massa molecular de aproximadamente 150 KDa consistindo em um polipeptídio (apoproteína) carregando um cromóforo, a fitocromobilina, a qual é um tetrapirrol linear. O cromóforo, sintetizado no plastídio, é a porção não protéica do fitocromo, responsável pela absorção da luz. A união do cromóforo com a apoproteína ocorre no citoplasma por um processo autocatalítico (Lagarias & Lagarias, 1989).

Há duas formas interconvertíveis de fitocromo, uma ativa e outra inativa. A forma inativa do fitocromo (Fv) absorve o comprimento de onda do vermelho (V) e é convertida à forma biologicamente ativa (Fve). A reversão de Fve a Fv se dá pela absorção do vermelho-extremo (VE) pelo Fve, porém, a conversão não é total, pois VE converte somente 97% de Fve a Fv, e V converte somente 85% de Fv a Fve. A reversão de Fve a Fv também pode ocorrer no escuro (Lagarias & Lagarias, 1989). Além disso, ambas as formas do fitocromo podem absorver o comprimento de onda do azul (Figuras 1 e 2). Deste modo, os efeitos do fitocromo podem ser fornecidos pelo azul, o qual também converte Fv a Fve, porém, a efetividade da conversão se restringe ao V e VE (Taiz e Zeiger, 1998).

Figura 1 - Picos de absorção de Fv (V, 650-680nm) e Fve (VE, 710-740). No entanto, Fv também absorve um pouco na faixa do VE, e Fve absorve uma quantidade considerável do V. Note que além da faixa do vermelho, as formas de fitocromo também possuem picos de absorção nos comprimentos de onda do azul (320-400nm) e ultravioleta (280nm)

Figura 2 - Fotoconversão das formas do fitocromo. A forma Fv absorve o V e é convertida a Fve. A forma Fve absorve VE e é revertida a Fv. O processo de reversão a Fve também ocorre no escuro. Além disso, a conversão de Fv a Fve é induzida pelo comprimento de onda do azul

Evidências de que as angiospermas possuem várias espécies de fitocromos codificados por uma pequena família de genes foram verificadas inicialmente em estudos com *Arabidopsis thaliana* (Sharrock & Quail, 1989), a qual é um dos principais modelos genéticos para o estudo de diversos processos fisiológicos. Os estudos com *Arabidopsis* são facilitados por seu ciclo de vida curto e tamanho reduzido, além de possuir um genoma muito pequeno. Cinco genes do fitocromo foram isolados nesta espécie: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, que codificam as apoproteínas *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, as quais após se ligarem ao cromóforo formam os fitocromos *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* e *phyE*, respectivamente. Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) também foram encontrados cinco genes para apoproteínas *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF* (Pratt et al., 1997). Entretanto, o tomateiro tem sido um excelente modelo para estudar a função do fitocromo. A família de genes do fitocromo tem sido caracterizada (Pratt et al., 1997), e estudos com mutantes estão revelando que os fitocromos de tomateiro têm funções similares, mas não idênticas às de *Arabidopsis* (Kendrick et al., 1997).

Os fitocromos podem agir de três diferentes modos, de acordo com a qualidade e a duração da luz requerida para induzir respostas na planta: respostas de fluência muito baixa (RFMB), resposta de baixa fluência (RBF) e respostas de alta irradiância (RIA).

Em RFMB, a fluência necessária para induzir uma resposta inicia-se com apenas 0.1 nmol.m^{-2} , e satura com 50 nmol.m^{-2} . A quantidade de luz necessária para induzir RFMB converte menos do que 0.02% do fitocromo total na forma ativa. Deste modo, o VE, que poderia reverter o efeito do V, converte 97% do Fve a Fv, e os 3% do fitocromo que permanece na forma ativa é suficiente para induzir RFMB (Figura 3). Isto ocorre devido ao fato da forma inativa do fitocromo (Fv) também absorver um pouco de VE e se tornar ativa, mesmo sob saturação de VE, resultando em 3% de Fve. Essa pequena quantidade de fitocromo na forma ativa é bem maior do que os 0,02% necessários para induzir RFMB. Portanto, o VE não pode reverter às respostas de fluência muito baixa (Mandoli & Briggs, 1984).

Outras respostas mediadas por fitocromos podem ser iniciadas com fluências que alcançam até $1.0 \mu\text{mol.m}^{-2}$, e são saturadas a $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$. Estas respostas são referidas como RBF, e apresentam a clássica indução por V e

reversão por VE (Taiz e Zeiger, 1998). Deste modo, sob contínua exposição ao V ou pulsos de V, uma grande proporção de moléculas de phyB (85%) converte-se na forma ativa (Figura 3).

As RIA necessitam de prolongada ou contínua exposição à luz, sendo saturadas em quantidades pelo menos 100 vezes a fluência apresentada por RBF. Este modo de resposta do fitocromo também não mostra reversibilidade (Taiz e Zeiger, 1998).

Figura 3 - Interação entre fluência e comprimento de onda da luz nos tipos de respostas do fitocromo. Plantas crescidas sob V acumulam preferencialmente phyB. Nestas condições, a forma Fv deste tipo de fitocromo (phyBv) irá absorver V e se converter na forma ativa (phyBve). Contudo, a forma phyBve (Fve) também absorve um pouco de V, se convertendo novamente em phyBv. No equilíbrio fotoestacionário, 85% de phyB estará na forma ativa, o que é suficiente para induzir respostas de baixa fluência (RBF). Do mesmo modo, na saturação com VE, o tipo de fitocromo que acumula nestas condições (phyA) estará com 97% de suas moléculas na forma inativa (phyAv) e somente 3% na forma ativa (phyAve). Contudo, esta quantidade de phyA ativo é mais do que suficiente para induzir resposta de fluência muito baixa (RFMB)

RFMB e RIA são mediadas por phyA. Entretanto, RBF é mediada por phyB, como verificado em mutantes deficientes no acúmulo destes tipos de fitocromos. Sob pulsos de V ou contínuo V, uma grande proporção de phyB apresentam-se na forma ativa. Sob V, uma grande quantidade de phyA é reduzida, porém, níveis elevados deste fitocromo encontram-se na forma ativa. Finalmente, sob V o efeito de RIA não é estabelecido, pelo menos em níveis suficientes, devido ao pouco

acúmulo de phyA. Sob contínuo VE, a proporção de phyB na forma ativa é muito baixa para induzir RBF (Casal, 1998).

2.1.2 Mutantes fotomorfogênicos

A base genética da fotomorfogênese pode ser investigada utilizando-se mutantes específicos tanto para a biossíntese de fotorreceptores quanto para a via de transdução de sinal desencadeada por eles. Tais mutantes podem auxiliar na elucidação de processos fisiológicos dependentes direta ou indiretamente da luz (Van Tuinen et al., 1997).

Mutantes deficientes na síntese das apoproteínas PHYA e PHYB do fitocromo, mutantes com deficiência na síntese do cromóforo, os quais são deficientes para todos os tipos de fitocromo, e mutantes com prováveis alterações na via de transdução de sinal têm sido descritos em várias espécies (Kendrick & Kronenberg, 1994). Em tomateiro, Van Tuinen et al., (1995a) descreveram mutantes com deficiência na síntese da apoproteína PHYA (*fr1*), e Van Tuinen et al., (1995b) descreveram mutantes na síntese da apoproteína PHYB1 (*tr1*). Kerckhoffs, et al., (1999) caracterizaram mutantes de tomateiro deficientes na síntese da apoproteína PHYB2. Mutantes apresentando deficiência na síntese do cromóforo (*au* e *yg-2*) foram descritos por Terry & Kendrick, (1996). Posteriormente, Kendrick et al., (1997) relataram mutantes com alterações na via de transdução de sinal (*hp-1*, *hp-2*, *atve lp*), os quais apresentam superexpressão do fitocromo (Figura 4).

Figura 4 - Deficiência na síntese e na expressão do fitocromo em mutantes de tomateiro. Os mutantes *fri* e *tri* são defeituosos para a fabricação das apoproteínas *PHYA* e *PHYB1*, respectivamente. As mutações *au* e *yg-2* possuem alterações na via de biossíntese do cromóforo. Os genes necessários para a biossíntese do cromóforo estão no núcleo, porém, sua molécula é montada no plastídio. As alterações fotomorfogênicas nos mutantes *hp*, *hp-2*, *dg*, *atv* e *lp* ocorrem na via de transdução de sinal do fitocromo (Adaptado de Kendrick et al. 1997)

O mutante recessivo *au* (*aurea*) é um dos mais caracterizados mutantes fotomorfogênicos. Terry & Kendrick (1996) demonstraram que este mutante apresenta deficiência na atividade da enzima fitocromobilina sintase, a qual converte biliverdina a fitocromobilina no processo de síntese do cromóforo. Plântulas destes mutantes crescidas sob luz branca são alongadas, têm o desenvolvimento do cloroplasto danificado e níveis reduzidos de clorofila e antocianina (Koorneef et al., 1985). Embora plantas adultas de mutantes *au* sejam menos deficientes no fitocromo do que plântulas de *au*, elas retêm a coloração amarelo-ouro que dá ao mutante este nome (Koorneef et al., 1985; López-Juez et al., 1990; Becker et al., 1992).

Plântulas de *au* crescidas no escuro perdem, pelo menos, 95% do fitocromo detectado imunologicamente (Parks et al., 1987) e espectrofotometricamente (Koorneef et al., 1985, Adamse et al., 1988, Lipucci Di Paola et al., 1988). Plantas adultas de *au* têm apresentado uma redução de 50% nos níveis de fitocromo quando comparadas aos do tipo selvagem (Adamse et al., 1988, López-Juez et al., 1990). Os níveis de clorofila nestes mutantes, verificados por Koorneef et al. (1985) e López-Juez et al. (1990), variaram entre 33% a 61% daqueles apresentados pelo tipo selvagem, dependendo das condições de luz e temperatura. Surpreendentemente, a taxa fotossintética dos mutantes *au* foi similar a do tipo selvagem, apesar do reduzido teor de clorofila (López-Juez et al., 1990; Becker et al., 1992). Outro aspecto apresentado nos mutantes *au* é a baixa taxa germinação de sementes no escuro comparado à do tipo selvagem (Koorneef et al., 1985). Entretanto, este genótipo é uma ferramenta muito utilizada para estudar fotorreceptores por comparação quantitativa ao tipo selvagem (Adamse et al., 1988, López-Juez et al., 1990).

Outras mutações recessivas com deficiência na percepção da luz podem ser observadas em *Lycopersicon*. O mutante *fri* (*far red insensitive*) aparece em plantas insensíveis ao comprimento de onda do vermelho-extremo. A função do *phyA* revelada nos mutantes *fri* é equivalente àquela fornecida pelos mutantes deficientes no acúmulo de *phyA* em *Arabidopsis*. O acúmulo de fitocromo (*phyA*) em plantas cultivadas sob VE é a tentativa de inibir o alongamento do hipocótilo durante o estiolamento (Whitelam & Harberd, 1994) e a deficiência no acúmulo de *phyA* sob VE, após o período de germinação no escuro, causa um estiolamento proeminente nestes mutantes (Figura 5), porém, quando crescidos sob luz branca, o fenótipo de *fri* é quase indistinguível ao do tipo selvagem (Van Tuinen et al., 1995). Deste modo, *phyA* parece ter uma função limitada na fotomorfogênese, restrita às respostas sob VE. Por exemplo, poderia ser importante para sementes que germinam sob uma densa cobertura vegetal, ou enterradas no solo, condições que apresentam proporções elevadas de VE (Taiz & Zeiger, 1998).

Níveis bastante reduzidos da apoproteína PHYA foram observados em plantas estioladas de *fri*. Por outro lado, tanto plântulas do tipo selvagem quanto de *fri* mostraram similaridade na presença de PHYB1. Pratt et al., (1997), avaliando

a presença de PHYA em tecidos de tomateiro, constataram abundância deste polipeptídio nas raízes. A presença de PHYA também variou ao longo do dia. Próximo ao meio-dia e à meia-noite, a quantidade desta apoproteína alcançou o mínimo e máximo, respectivamente. Moller et al., (2002) relataram que, apesar da abundância de phyA em plantas que crescem no escuro, a degradação deste tipo de fitocromo é rápida. Segundo Quail et al., (1995) a expressão do gene *PHYA* é reprimida pela luz.

Plantas deficientes temporariamente na percepção do comprimento de onda do vermelho, mutantes recessivos *tri* (*temporary red insensitive*), também foram encontradas em tomateiro. O fitocromo tipo B (phyB) é o pigmento envolvido na percepção de plantas crescidas sob V, com o mesmo objetivo de inibir o alongamento do hipocótilo. Mutantes de tomateiro que estiolam sob este comprimento de onda são deficientes no acúmulo de phyB1 (Figura 5), e um atraso temporário por aproximadamente dois dias na inibição do alongamento do hipocótilo pode ser observado após a transferência do escuro para o V. Em extratos de plântulas de *tri*, foram detectados baixos níveis da apoproteína PHYB1, porém os níveis de PHYA apresentaram-se semelhantes aos do tipo selvagem (van Tuinen et al., 1995b).

Figura 5 - Mutantes deficientes no acúmulo de phyA apresentam um estiolamento proeminente após a transferência do escuro para o VE (esquerda). Sob V, mutantes deficientes no acúmulo de phyB estiolam por um período de aproximadamente dois dias após a transferência do escuro para o V

Plantas de *tri* crescidas sob luz branca são pouco maiores do que as do tipo selvagem. Em condições de altas proporções de VE, os mutantes *tri* são consideravelmente maiores do que o tipo selvagem, indicando que phyB1 fornece uma função quantitativa na regulação do alongamento em plantas de tomateiro (Kerckhoffs et al., 1997c). A função atribuída ao phyB na inibição do alongamento do hipocótilo sob V é também observada em *Arabidopsis*, porém, a similaridade é menos evidente do que àquela apresentada entre os mutantes deficientes no acúmulo de phyA de tomateiro e *Arabidopsis* (Van Tuinen et al., 1995b).

O fitocromo tipo B parece também regular a germinação de sementes, um fenômeno que originalmente levou a descoberta do fitocromo. Sementes de *Arabidopsis* do tipo selvagem apresentam reversibilidade V/VE durante a germinação. Mutantes destas plantas que perdem o phyA respondem normalmente à luz vermelha. Entretanto, mutantes deficientes no acúmulo de phyB são incapazes de responder ao V. Este evento sugere que phyB modula a fotorreversibilidade durante a germinação de sementes (Shinomura et al., 1996).

Van Tuinen et al., (1995) avaliaram nos mutantes *tri* o comprimento do hipocótilo, a área do cotilédone e os níveis de clorofila e antocianina sob comprimentos de onda do V, VE e B (azul), além do escuro. Sob VE e escuro, nenhuma diferença foi observada para as variáveis. Sob B, os mutantes apresentaram pouco alongamento do hipocótilo comparado ao do tipo selvagem. Nos tratamentos com V, os mutantes *tri* apresentaram um maior alongamento do hipocótilo, redução no acúmulo de antocianina no hipocótilo e, apesar da redução da área dos cotilédones, estes tecidos acumularam bastante clorofila. Segundo estes autores, a relação inversa entre a área dos cotilédones e os níveis de clorofila, sugere que a mutação pouco afeta a produção deste pigmento.

Mutantes exibindo uma resposta exagerada à luz têm sido descritos em tomateiro: *high-pigment (hp)*, *dark green (dg)*, *Intense pigment (lp)* e *atroviolacea (atv)*. Estas mutações conferem alta pigmentação ao caule, folha e fruto nestes genótipos (Kendrick et al., 1994). A síntese do fitocromo nestes mutantes ocorre normalmente, sem alterações na formação da apoproteína ou do cromóforo, sugerindo que a alteração está na via de transdução de sinal, promovendo a

superexpressão dos fitocromos durante a fotomorfogênese (Kerckhoffs et al., 1997b).

O mutante recessivo *hp* é caracterizado pela produção de altos níveis de carotenos (β -caroteno e licopeno) e carotenóides (xantofilas), além de apresentar elevados teores de vitamina C em frutos maduros. A coloração verde escura do caule, folhas e frutos imaturos é devido à alta concentração de clorofila, comparada a do tipo selvagem (Thompson et al., 1962; Kerr, 1965; Von Wettstein-Knowles, 1968a, 1968b). O aumento no acúmulo de pigmentos fotossintéticos nos mutantes *hp* foi proposto por Yen et al., (1997) ser devido ao elevado número de cópias do genoma plastidial observado nestes mutantes. Também estes autores atribuíram à concentração significativa de carboidratos nos frutos destes mutantes, o fato de acumularem pigmentos fotossintéticos. Entretanto, os mutantes de *hp* são instrumentos interessantes para explorar geneticamente a qualidade dos frutos de tomateiro (Darby, 1978).

O hipocótilo dos mutantes *hp* apresenta pouco acúmulo de antocianina apenas em condições de baixa luminosidade (Kerr, 1965). Entretanto, sob comprimentos de onda do V ou amarelo, o hipocótilo acumula mais antocianina e intensifica a inibição do alongamento quando comparado ao tipo selvagem (Kerr, 1965; Mochizuki & Kamimura, 1985; Peters et al., 1989).

Outras alterações fisiológicas têm sido observadas em plântulas de *hp*. Trabalhos com enzimas como fenilalanina amoniô-liase (Goud et al., 1991), nitrato redutase, nitrito redutase e amilase (Goud & Sharma, 1994) sugerem o fitocromo como regulador da atividade destas enzimas (Goud et al., 1991; Goud & Sharma, 1994).

O acúmulo de fitocromo em plântulas estioladas de *hp* e no tipo selvagem é similar. Deste modo, as diferenças observadas nestes dois genótipos não podem ser explicadas pelos níveis de fitocromo na forma ativa, sugerindo que a mutação *hp* amplifica as respostas mediadas pelo fitocromo. Provavelmente, a perda da função do gene *HP*, o qual deve codificar um regulador negativo da atividade do fitocromo em tomateiro, permite a superexpressão deste fotorreceptor (Peters et al., 1992).

Os mutantes *atv* e *lp* são similares em alguns aspectos ao mutante *hp* (Kendrick et al., 1994). O mutante *atv* apresenta elevados níveis de antocianina principalmente em baixas temperaturas, no caule, vasos condutores da folha e nos frutos imaturos (Rick et al., 1968; Von Wettstein-Knowles, 1968a, 1968b). O mutante *lp* assemelha-se ao *hp*, porém, em *lp*, a mutação é dominante e os aspectos da superexpressão do fitocromo são mais evidentes (Rick, 1974).

Kerckhoffs et al., (1997b) caracterizaram comparativamente os *mutantes* *hp*, *atv* e *lp*. Para a análise de fitocromo total após 4h de V, os genótipos *hp* e *atv* apresentaram níveis similares comparado aos do tipo selvagem. Porém, o mutante *lp* apresentou menores níveis. Durante a inibição do alongamento do hipocótilo sob V, VE e B, os três mutantes responderam de modo semelhante, apresentando uma forte inibição deste tecido. Maiores teores de clorofila e antocianina foram encontrados, respectivamente nos mutantes *hp* e *atv*.

2.2 Micro-Tom como modelo fisiológico

A utilização do tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) como um modelo para estudar processos biológicos oferece várias vantagens em relação a *Arabidopsis thaliana*. A diversidade de metabólitos secundários (Tanksley, 1992) e tecidos que facilitam análises bioquímicas, além do próprio padrão morfogênético diferente de *Arabidopsis*, colocam o tomateiro como um modelo adicional de dicotiledônea em estudos comparativos (Pratt et al., 1997). Como *Arabidopsis*, o tomateiro possui um genoma relativamente pequeno e poucas seqüências repetitivas de DNA (Zamir & Tanksley, 1988), características que facilitam o conhecimento das estruturas genômicas. Embora muitos genes importantes podem ser isolados e caracterizados em *Arabidopsis*, o tomateiro possui vários genes de importância econômica, os quais não estão disponíveis em *Arabidopsis* (Wing et al., 1994). Devido à alta capacidade de regeneração por hipocótilo e cotilédones, Lipucci di Paola et al., (1983) destacam o tomateiro como um excelente modelo para estudos de cultura de tecidos *in vitro*.

As principais limitações para a utilização intensiva de tomateiro como modelo em abordagens genética de diversas questões fisiológicas são seu

tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em franca desvantagem quando comparados aos de *Arabidopsis*. Tomando-se vantagem da própria riqueza do germoplasma de tomateiro, há possibilidade de se criar um sistema de estudos nessa espécie nos moldes que se tem hoje em *Arabidopsis*. Deste modo, a cultivar miniatura de tomateiro, recentemente proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-150ml de substrato, completando seu ciclo de vida em 70-90 dias. Com essas características, a chamada cultivar Micro-Tom pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis*. O ciclo de vida curto da cv Micro-Tom possui a vantagem adicional de facilitar a obtenção de micro-plantas necessárias aos estudos fisiológicos.

Mutantes de tomateiro têm sido usados como uma eficiente ferramenta em genética para compreender os genes e suas funções. Poucas mutações foram bem caracterizadas a nível molecular nesta espécie, apesar de terem sido coletadas por muitas décadas, como mutações espontâneas e induzidas (Emmanuel et al., 2002). Exemplos de tais mutações são as na síntese e expressão do fitocromo já descritas, mutações na síntese e sensibilidade a hormônios, como mutantes para auxina (Kelly & Bradford, 1986), para etileno (Fujino et al., 1988; Wilkinson et al., 1995), para GA (Bensen & Zeevaart, 1990), para ABA (Burbidge et al., 1999) e para brassinoesteróide (Koka et al., 2000). Ocorre também mutantes que alteram a competência para a regeneração *in vitro* (Koornneef et al., 1993), além de outras mutações que envolvem vários aspectos do desenvolvimento de tomateiro e variações genéticas que promovem a alta capacidade de regeneração *in vitro* desta espécie.

2.3 Variação genética na capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro

Apesar da ampla utilização da cultura de tecidos e das informações que compõem a prática desta atividade, os mecanismos moleculares que governam a capacidade de regeneração *in vitro* ainda são pouco compreendidos. A identificação e a clonagem de genes que regulam a regeneração possibilitarão

um avanço importante para compreender tais mecanismos (Koornneef et al., 1993).

A base genética das variações que ocorrem na cultura de tecidos tem sido estudada em várias espécies. Estes estudos mostraram significantes habilidades destas espécies em regenerar plantas *in vitro* (Koornneef et al., 1993). No que se refere ao estudo da capacidade de regeneração *in vitro*, diferenças genéticas também têm sido amplamente relatadas em tomateiro (Kut & Evans, 1982; Koornneef et al., 1987; Stommel & Sinden, 1991; Faria & Illg, 1996; Peres et al., 2001), sendo a mesma controlada por poucos genes (Koornneef et al., 1987; Faria & Illg, 1996). Somente um reduzido número de genótipos de *Lycopersicon* possui a capacidade de regenerar novas plantas a partir de explantes radiculares (Peres et al., 2001). Koornneef et al. (1993) constataram que a capacidade de regeneração de explantes radiculares em *L. peruvianum* é controlada por um único locus (*Rg1*), o qual foi introgridido na cv MsK (*L. esculentum*). Durante a introgressão, estes autores observaram nas gerações obtidas a presença da cor amarela do fruto, e constataram que este efeito é promovido por uma mutação recessiva *r* (yellow flesh), a qual cossegrega com o locus *Rg1*, devido a mesma localização no cromossomo 3. Esta característica do fruto é portanto um marcador morfológico para o locus da alta capacidade de regeneração (Figura 6).

Figura 6 - O locus *Rg1* e a mutação *yellow flesh* (*r*) estão no mesmo cromossomo 3 da cultivar MsK

A presença de um fator que promova a alta competência para regeneração *in vitro* em tamateiro poderá permitir uma melhor aplicação das técnicas da biologia celular e molecular bem como o melhoramento de genótipos economicamente importantes (Koornneef *et al.*, 1987).

2.4 Competência para regeneração *in vitro*

Durante a cultura de tecidos vegetais *in vitro*, células somáticas podem ser capazes de formar órgãos, como caules e raízes, dependendo dos fatores presentes no meio. Como é bem conhecido, uma variedade de fatores biológicos, químicos e físicos afeta o padrão da organogênese *in vitro* (Thorpe, 1994). Observando a formação de órgãos a partir de explantes de tabaco, Skoog e Miller, (1957) mostraram que a organogênese é governada pelo balanço de auxina e citocinina presentes no meio. Estes autores demonstraram que a proporção de auxina e citocinina, favorável à auxina, induziu a formação de raízes, por outro lado, a proporção favorável a citocinina, induziu a formação de caules. A proporção intermediária entre os dois hormônios formou apenas calos.

Segundo Christianson & Warnick (1988), a formação de gemas em explantes foliares de *Convolvulus arvensis* pode ser dividida em três fases: aquisição de competência, indução e diferenciação (Figura 7). Na primeira fase, a desdiferenciação inicial de células dos explantes resultou na formação de calos com células ou grupos de células competentes, ou seja, capazes de responder aos efeitos estimulatórios do meio de cultura para a formação de gemas, compreendendo a fase de indução. Na terceira fase, a transferência destas células já competentes para meios indutores de gemas tornou-as determinadas, isto é, comprometidas com uma rota específica de desenvolvimento. As células, a partir daí, diferenciaram em primórdios de gemas, mesmo se transferidas para meios não indutores (Cary *et al.*, 2001). Um exemplo de tecido com baixa determinação e elevada competência tanto para formação de raízes quanto de gemas caulinares é o calo. O calo é considerado um tecido pouco diferenciado, podendo ser induzido, tornando-se determinado e, finalmente, sofrer diferenciação para formar gemas caulinares ou raízes (Peres, 2002). Portanto,

vários fatores ambientais podem estar envolvidos no processo de regeneração, alterando muitas vezes o padrão morfogênético *in vitro*. Dentre os fatores ambientais envolvidos na regeneração, a luz exerce um papel fundamental neste processo, e estudos recentes têm revelado o envolvimento de fotorreceptores na aquisição de competência para regeneração (Bertram & Lercari, 2000).

Figura 7 - Modelo de Christianson e Warnick (1985, 1988) aplicado ao trabalho de Skoog e Miller (1957). O balanço entre auxina (AIA) e citocinina (CKs) promove a indução de tecidos e células para formar raízes ou caules

2.5 Regeneração *in vitro* como uma resposta fotomorfogenética

A função de pigmentos fotomorfogênicos no processo de regeneração *in vitro* é ainda uma questão aberta, apesar de estudos mostrando que a duração e a qualidade da luz influenciam a formação de caules e raízes (Hughes, 1981; Lercari et al., 1986; Economou et al., 1987; Marcenaro et al., 1994). A natureza dos fotorreceptores envolvidos no fotocontrole durante a diferenciação de células *in vitro* ainda requer muitos estudos. A cultura de tecidos, a qual pode ocorrer

independentemente da fotossíntese, torna-se um sistema interessante para estudar a função dos fotorreceptores neste sistema (Lercari et al., 1986).

Estudos com calos de tabaco realizados por Weis & Jaffe (1968) e Seibert et al. (1975) revelaram que a formação de gemas caulinares é aumentada por tratamentos com luz azul, porém, a luz vermelha não promove esta resposta. O comprimento de onda do V, por outro lado, promove a formação de gemas adventícias em algumas espécies (Ward & Vance, 1968). O efeito reversível do V/VE na organogênese de cotilédones de alface foi observado por Kadkade & Seibert, (1977). Estes autores verificaram que o V aumenta significativamente a formação de caules, sugerindo a participação do fitocromo neste evento.

Expondo calos de *Actinidia deliciosa* sobre V, VE e B, Muleo & Morini (1990) observaram uma quantidade significativa de caules formados sob V, comparada aos tratamentos com B e VE. A formação de raízes também foi observada para todos os tratamentos, porém, sob V houve uma resposta mais rápida. Lercari et al. (1986), relataram que tratamentos com V e luz branca aumentaram a porcentagem de regeneração a partir de cotilédones de tomateiro.

Em estudos comparativos da capacidade de regeneração a partir de explantes de hipocótilos de mutantes *au* e do tipo selvagem, Lercari et al. (1988) mostraram que os dois genótipos apresentam diferenças na resposta regenerativa na presença de luz branca. O mutante *au* regenerou caules apenas de segmentos do ápice do hipocótilo, enquanto nenhuma diferença foi observada entre os segmentos basal, intermediário e apical do hipocótilo do tipo selvagem. Além disso, explantes de hipocótilos de tomateiro não regeneraram caules no escuro, mesmo na presença de diferentes concentrações de auxina e citocinina. Desta forma, estes autores assumem que a luz é um fator imprescindível na organogênese a partir de hipocótilos de tomateiro.

Posteriormente, Lercari et al. (1999), avaliaram o efeito do V, VE, B e luz branca na capacidade de regeneração do hipocótilo de plântulas de mutantes *au* e tipo selvagem cultivados na luz e no escuro. Sob luz branca, apenas segmentos da porção apical do hipocótilo dos mutantes *au* cultivados na luz regeneraram. Para o tipo selvagem, não houve diferença na regeneração entre a porção basal, intermediária e apical. Quando cultivados no escuro, os mutantes

au não apresentaram regeneração do hipocótilo, enquanto no tipo selvagem houve regeneração em menores proporções. Sob V ou VE, apenas uma gema caulinar foi formada dentre 500 explantes retirados de hipocótilo de mutantes *au* cultivados na luz. Os mesmos comprimentos de onda promoveram alta capacidade regenerativa da porção apical dos hipocótilos do tipo selvagem. As respostas ao B foram similares às aquelas encontradas sob V e VE para o tipo selvagem. Para os mutantes *au*, o B promoveu diferenças na capacidade de regeneração da porção basal, intermediária e apical, sendo a última a região que apresentou maior regeneração. Considerando o efeito dos diferentes comprimentos de onda na capacidade de regeneração de hipocótilos do mutante *au* e tipo selvagem, os resultados suportam a sugestão de que fitocromos possuem uma função crucial na regeneração de hipocótilos de tomateiro. Porém, o mutante *au* é deficiente em todos os tipos de fitocromo (Terry & Kendrick, 1996), não sendo possível comparar isoladamente a função de cada tipo de fitocromo em tomateiro (Bertran & Lercari, 2000).

Para verificar o envolvimento dos fitocromos phyA e phyB1 na aquisição de competência para formação de gemas a partir de hipocótilos de tomateiro, Bertran & Lercari (2000) utilizaram mutantes deficientes no acúmulo de phyA (*fr1*) e no acúmulo de phyB1 (*tr1*), comparando-os ao tipo selvagem. Em plantas pré-cultivadas no escuro, todos os genótipos apresentaram capacidade significativa de regeneração sob luz branca, apenas em segmentos apicais do hipocótilo. Pouco foi observado para a porção basal e intermediária, mostrando o efeito do estiolamento no decréscimo da capacidade de regeneração. Por outro lado, uma quantidade substancial de gemas formadas das três regiões do hipocótilo foi observada nos três genótipos quando pré-cultivados na luz branca. Tratamentos com V, VE e luz branca têm o mesmo efeito para plantas do tipo selvagem. Porém, os mutantes *tr1* pré-tratados com V ou VE mostraram um gradiente de formação de gemas dependente da posição do hipocótilo, com um acréscimo na região apical. Estas respostas sugerem que durante o desenvolvimento das plântulas de tomateiro, phyB1, o qual é ausente no mutante *tr1*, é necessário para induzir a capacidade regenerativa *in vitro* a partir de explantes da porção basal e intermediária do hipocótilo. Os mutantes *fr1*, cultivados sob V e luz branca,

apresentaram similaridade durante a regeneração basal, intermediária e apical dos explantes do hipocótilo. Porém, quando tratadas com VE, os mutantes *fri*, apesar da baixa capacidade de regeneração, apresentaram maiores respostas do que quando as mesmas foram cultivadas no escuro, sugerindo que um fitocromo diferente de phyA apresentou-se na forma ativa durante a regeneração. Como já relatado, os mutantes *tri* também mostraram um gradiente de regeneração quando pré-cultivados sob VE, confirmando a necessidade de phyB1 na forma ativa durante a aquisição de competência para regeneração. Estas observações indicam que a percepção do VE pelo phyA induz ao máximo a capacidade de regeneração de segmentos da porção basal, intermediária e apical do hipocótilo somente na presença do phyB1. Estes resultados sugerem que a aquisição de competência para regeneração de caules a partir de hipocótilos é mediado, pelo menos, por duas formas distintas de fitocromos, phyA e phyB1 (Bertran & Lercari, 2000).

Tyburski & Tretyn (1999) puderam avaliar a capacidade organogenética como uma resposta à luz utilizando mutantes de tomateiro que superexpressam o fitocromo (*hp*) e o mutante *au*, o qual é deficiente em todos os tipos de fitocromo. Foi observado que a formação de gemas caulinares nos mutantes *hp* e no tipo selvagem ocorreu somente na luz, e que a regeneração foi maior para *hp* em todos os tratamentos de luz. A formação de caules nos mutantes *au* ocorreu ocasionalmente apenas na presença de V ou luz branca. Resultados diferentes foram observados por Kraepiel et al. (1995) quando os mesmos verificaram que mutantes *pew1* de tabaco, equivalente ao mutante *au* de tomateiro, e o tipo selvagem regeneraram caules tanto na luz quanto no escuro.

O envolvimento de fotorreceptores no processo de regeneração *in vitro* implica na relação direta ou indireta da luz no controle da atividade hormonal. Assim, a interação entre estes dois fatores pode determinar o padrão de desenvolvimento da planta.

2.6 Interação entre fotomorfogênese e hormônios

A luz controla quase todos as etapas do desenvolvimento da planta. Entretanto, a sequência de eventos que ocorre após a percepção da luz ainda é muito pouco elucidada (Furuya, 1993). Tem sido proposto a participação de hormônios vegetais nos mecanismos que traduzem os sinais da luz. Segundo Chory et al., (1994), dependendo da espécie e condições de experimento, luz e hormônios podem participar dos mesmos eventos do desenvolvimento da planta. Como fotorreceptores, fitocromos podem mediar muitos passos da interação entre luz e hormônios (Halliday & Franckhauser, 2003).

2.6.1 Fitocromo e etileno

Tem sido observado que luz e etileno induzem respostas opostas no desenvolvimento da planta. Por exemplo, a aplicação de etileno anula o efeito estimulatório da luz, como observado por Goeschl et al., (1967) durante a expansão dos cotilédones em plântulas de ervilha. Foi observado também um decréscimo na taxa de etileno quando estas plântulas foram tratadas com luz, sugerindo que a luz inibe a síntese de etileno, pelo menos neste caso. Em *Arabidopsis*, o mecanismo parece ocorrer de maneira diferente, pois a abertura do gancho plumular ocorre em resposta a luz mesmo em altas concentrações de etileno, sugerindo que a percepção, mais do que a produção do etileno é modulada pela luz (Knee et al., 2000).

Apesar do conhecimento da interação entre luz e etileno durante vários estágios do ciclo da planta, a natureza molecular destes eventos ainda não foi esclarecida (Halliday & Franckhauser, 2003).

2.6.2 Fitocromo e citocininas

O efeito da luz em muitos processos do desenvolvimento da planta pode ser observado também após a aplicação de altas concentrações de citocininas em plântulas cultivadas no escuro. Em *Arabidopsis*, este efeito permite observar a

diferenciação do cloroplasto, inibição do alongamento do hipocótilo e expansão dos cotilédones e da folha (Chory et al., 1994). Porém, o mutante *amp1* de *Arabidopsis*, o qual acumula altos níveis de citocininas, apresenta os mesmos aspectos de plantas selvagens quando crescidas no escuro (Chin-Atkins et al., 1996). Portanto, a aplicação de citocininas não parece ter o mesmo efeito em todas as espécies vegetais. Em ervilha, por exemplo, o crescimento do epicótilo no escuro foi inibido por aplicação de citocinina. Este evento não promove o desenvolvimento das folhas na ausência da luz (Seyedi et al., 2001). As citocininas têm um efeito surpreendente nos mutantes *lip1* de ervilha. No escuro, os mutantes *lip1* acumulam baixos níveis de *phyA* comparados aos do tipo selvagem, entretanto, tratamentos com citocininas suprem esta deficiência (Seyedi et al., 2001). Desta forma, estes resultados indicam que a interação entre luz e citocininas pode ser específica para cada espécie (Halliday & Franckhauser, 2003).

2.6.3 Fitocromo e giberelinas

Os melhores processos envolvendo a regulação pela luz e giberelinas (GAs) são a germinação de sementes e o alongamento do caule, onde os dois fatores agem de modo antagônico. Vários estudos têm verificado as relações entre luz e GAs nestes processos, e os resultados muitas vezes são contrastantes (Kraepiel & Miginiac, 1997). Toyomasu et al. (1993) avaliaram o efeito do V e VE no acúmulo de GA durante a germinação de sementes de alface, e observaram que o V induz o acúmulo de GA nestas sementes, promovendo a germinação. Em plantas de sorgo com deficiência no acúmulo de *phyB*, Childs et al. (1991) constataram que os níveis de GA são maiores, comparados aos do tipo selvagem. Além disso, Jordan et al. (1995) demonstraram que plantas transgênicas de tabaco superexpressando *phyA* apresentaram o nanismo. Estes resultados em conjunto com os dados encontrados por Campell & Bonner (1986), aqui não descritos, indicam que o fitocromo pode controlar alguns passos da via de biossíntese de GAs (Kraepiel & Miginiac, 1997). Porém, mutantes de ervilha deficientes em GA não exibiram nenhuma alteração durante o desenvolvimento em resposta à luz,

indicando que GA e luz agem por vias independentes (Behringer et al., 1990). Lupez-Juez et al. (1995), utilizando mutantes de pepino *lh* deficientes no acúmulo de phyB, Reed et al. (1996), usando mutantes *Arabidopsis* também deficientes em phyB, e Weller et al. (1994), usando mutantes fotomorfogénicos e deficientes em GA, mostraram que o acúmulo de GA não é regulada pela luz, mas a sensibilidade ao GA parece ser reduzida pela luz, sugerindo que a interação entre os dois sinais seja na via de sinalização.

Considerando o envolvimento de GAs na regulação do desenvolvimento pela luz, todos os dados sugerem uma interação entre estes dois fatores, embora seja necessário maiores investigações (Kraepiel & Miginiac, 1997).

2.6.4 Fitocromo e auxina

Vários autores têm verificado o transporte da auxina no hipocótilo de plântulas e o envolvimento deste hormônio na regulação do alongamento celular como uma resposta à luz (Kraepiel & Miginiac, 1997). O efeito inibitório do V sobre a biossíntese de auxina em coleoptiles de milho foi demonstrado por Lino (1982), sugerindo o fitocromo como um possível mediador deste processo (Halliday & Franckhauser, 2003). Anteriormente, Sherwin & Furuya (1973) relataram o efeito reversível de V/VE no transporte de auxina em coleoptiles de arroz. Além disso, Steindler et al. (1999) relataram que a disponibilidade de VE sob uma vegetação promove o estiolamento da planta devido à indução por este comprimento de onda no acúmulo de auxina. Porém, em plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando auxina, Romano et al. (1995) demonstraram que a regulação do alongamento do hipocótilo por auxina e luz ocorre de modo independente.

Utilizando mutantes de tabaco deficientes na síntese do cromóforo do fitocromo (*pew1* e *pew2*) Kraepiel et al. (1995) observaram um acréscimo nos níveis de auxina nestes mutantes. Resultados similares foram obtidos por Van Tuinen et al. (1995) e Kerckhoffs et al. (1996) utilizando mutantes *fri*, *tri* e duplos mutantes deficientes no acúmulo de phyA e phyB1 de tomateiro, sugerindo um envolvimento de phyA e phyB1 na regulação do acúmulo de auxina. Desta forma,

a somatória das evidências sugere que a luz induz um decréscimo nos níveis de auxina (Kraepiel & Miginiac, 1997).

2.6.5 Fitocromo e ácido abscísico

Luz e ácido abscísico (ABA) podem agir sinergisticamente em alguns casos (McElwain et al., 1992) e antagonisticamente em outros (Chang e Waling, 1991; Toyomasu et al., 1994). O efeito negativo da luz no acúmulo de ABA foi observado por Kraepiel et al. (1994). Estes autores verificaram um acréscimo de ABA em mutantes de tabaco deficientes na síntese do cromóforo (*pew1*) comparado ao do tipo selvagem, sugerindo que a degradação de ABA seja mediada pela luz. No caso da germinação de sementes de alface, Toyomasu et al. (1994) relataram correlações entre tratamento com luz, decréscimo nos níveis de ABA e germinação de sementes. Neste processo, a inativação de ABA poderia ser um passo importante. Estes resultados suportam a hipótese de que os processos fisiológicos envolvendo ABA dependem dos sinais trazidos pela luz. Entretanto, a relação entre os dois sinais ainda não foi estabelecida, e a importância fisiológica na regulação nos níveis de ABA pela luz permanece não esclarecida (Miginiac & Kraepiel, 1997).

2.6.6 Fitocromo e brassinoesteróide

A identificação do mutante *det2* em *Arabidopsis* foi a primeira indicação de uma possível interação entre luz e brassinoesteróide (BR). O mutante *det2* foi identificado por apresentar inibição no alongamento do hipocótilo, cotilédones expandidos e acúmulo de antocianina no hipocótilo mesmo quando crescidos na ausência de luz (Li et al., 1996).

Plântulas de *Arabidopsis* tratadas com inibidor de BR apresentaram o fenótipo similar àquele do mutante, além da transcrição de genes induzidos pela luz (Asami et al., 2000). Outros mutantes com deficiência na via de biossíntese ou sensibilidade ao BR já foram descritos para *Arabidopsis*, tomateiro, ervilha e arroz (Bishop et al., 2002). A hipótese mais aceita até o momento é que a luz inibe a

produção de brassinoesteróide, promovendo a inibição do alongamento do hipocótilo (Halliday & Franckhauser, 2003). Porém, Symons et al. (2002) relataram que a luz promove a produção de BR em plantas de ervilha, contrastando com os resultados apresentados.

O mutante *bas1* de *Arabidopsis* anula o efeito do alongamento do hipocótilo no mutante deficiente em *phyB*, nos duplos mutantes formados. O mutante *bas1* superexpressa o citocromo P450, o qual resulta na inativação de brassinolide (Neff et al., 1999), sugerindo uma possível ligação entre BR e fitocromo (Halliday & Franckhauser, 2003).

A somatória das observações feitas nos parágrafos anteriores parece indicar que os hormônios AIA, ABA, e BR possuem efeitos contrários à luz, enquanto as citocininas parecem se somar ao efeito da luz.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi incorporar as mutações fotomorfogênicas *au*, *fri*, *tri*, *hp*, *atv*, e *lp* bem como o locus de regeneração *Rg1* na cultivar Micro-Tom. As linhagens geradas foram utilizadas para:

- I) Avaliar o efeito das mutações fotomorfogênica e do locus *Rg1* na capacidade de regeneração *in vitro* de raiz, caule e folha sob luz branca.
- II) Avaliar o efeito dos comprimentos de onda do vermelho e vermelho-extremo na capacidade de regeneração *in vitro* de raiz, caule e folha carregando o locus *Rg1*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*): mutantes fotomorfogénéticos *au*, *fri*, *tri*, *hp*, *atv* e *lp* (Tabela 1), a cultivar Micro-Tom (Figura 8) e a cultivar MsK. Os parentais dos mutantes fotomorfogénéticos foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Chetelat do Tomato Genetics Research Center (TGRC, University of California, Davis, USA) e o parental Micro-Tom e MsK foram doados respectivamente pelos Drs. A. Levy (Weizmann Institute of Science – Israel) e Koornneef (Wageningen Agricultural University, Holanda).

Tabela 1 - Caracterização dos mutantes fotomorfogénicos

Mutantes	Características morfológicas e funções dos genes correspondentes	Referência
<i>aurea (au)</i>	Planta clorótica e estiolada mesmo na presença de luz. Lesão no gene que codifica o cromóforo do fitocromo.	Terry & Kendrick, (1996)
<i>far red insensitive (fri)</i>	Insensibilidade ao vermelho-extremo (VE). Deficiência no acúmulo de fitocromo em plântulas estioladas. Lesão no gene que codifica para fitocromo A.	Van Tuinen et al., (1995a)
<i>temporary red insensitive (tri)</i>	Insensibilidade ao vermelho (V). Hipocótilo alongado. Lesão no gene que codifica para fitocromo B1.	Van Tuinen et al., (1995b)
<i>Hight pigment (hp)</i>	Pigmentação verde-ecura da folhagem e dos frutos. Alteração na via de transdução do fitocromo.	
<i>atroviolaceae (atv)</i>	Pigmentação verde-escura da folhagem e dos frutos. Alteração na via de transdução do fitocromo.	Kendrick & Kronenberg, (1994)
<i>Intense pigment (lp)</i>	Pigmentação verde-escura da folhagem e dos frutos. Alteração na via de transdução do fitocromo.

Figura 8 - Parental Micro-Tom

4.2 Cruzamentos

Anteras foram retiradas de flores de mutantes fotomorfogênicos e armazenadas em estojos para relojoeiro na presença de CaSO_4 (dessecante), para que pudessem ser retirados pólenes. Posteriormente, plantas de Micro-Tom tiveram suas flores emasculadas para receber os pólenes coletados dos mutantes. Para a realização da retirada das anteras e emasculação das flores foi utilizada uma pinça nº 02.

4.3 Coleta e armazenamento de sementes

Sementes foram coletadas dos frutos juntamente com a polpa e deixadas por dois dias em copos plásticos com um pouco de água a fim de facilitar a separação de polpa e sementes, processo decorrente da fermentação. Posteriormente, o fermentado foi lavado com água em uma peneira onde sobraram apenas as sementes, as quais foram postas para secar em uma folha de papel. Após serem guardadas em envelopes de alumínio no interior de envelopes de papel, as sementes foram armazenadas em caixas plásticas contendo CaSO_4 e postas em geladeira.

4.4 Seleção dos genótipos obtidos de micro-mutantes fotomorfogênicos e micro-MsK

A geração F1 obtida do cruzamento entre os mutantes fotomorfogênicos e a cultivar Micro-Tom foi cultivada em vasos de 20L, devido ao porte grande promovido pela heterozigotidade dos alelos. Pólenes de F1 foram retirados para a realização do retrocruzamento com Micro-Tom, originando F1BC1. Concomitantemente, foi permitido que a autofecundação ocorresse em F1, originando F2. Em F2, bandejas foram utilizadas para a semeadura em alta densidade, a fim de obter plantas segregantes homozigotas apresentando porte pequeno e ao mesmo tempo mutações. A partir da geração F2 e F1BC1 o cultivo

ocorreu em vasos menores (150ml). A mesma metodologia foi utilizada para a cultivar MsK (Figura 9).

4.5 Cultivo em casa de vegetação

O substrato utilizado para o cultivo das plantas, foi preparado com proporções de 1:1 de Plantmax HT e vermiculita. Para cada litro de substrato foi adicionado 4g de calcário. Frequentemente, foram adicionados nutrientes minerais (NPK).

Para semeadura em vasos de 150ml, 3 a 5 sementes foram enterradas cerca 5mm em substrato. Para bandejas, a semeadura ocorreu aleatoriamente em alta densidade, sendo posteriormente cobertas por com uma fina camada de substrato. Para vasos de 20L, as sementes inicialmente foram semeadas em vasos de 250ml, para posteriormente serem transplantadas. Os vasos foram irrigados diariamente evitando-se que os mesmos permanecessem encharcados.

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC).

4.6 Testes para presença de mutações fotomorfogénéticas

4.6.1 Mutantes *hp*

Para observar as alterações fotomorfogénéticas nas plântulas de mutantes *hp*, sementes destes mutantes e do controle MT foram postas para germinar sobre duas folhas de papel de filtro embebidas com água destilada no interior de caixas gerbox sob contínuo comprimento de onda do amarelo, o qual foi obtido com uma lâmpada fluorescente (20W) sobre folhas de papel tipo celofane. O experimento ocorreu em uma incubadora para B.O.D a uma temperatura de 25°C por (Figura 10).

4.6.2 Mutantes *fri* e *tri*

Sementes de mutantes *fri*, *tri* e do controle MT foram postas para germinar sobre duas folhas de papel de filtro embebidas com água destilada no interior de caixas gerbox, as quais permaneceram no escuro para proporcionar o estiolamento das plântulas. Posteriormente, plântulas de *fri* ficaram expostas ao VE e plântulas de *tri* ao V até que o fenótipo esperado fosse visualizado. Para a obtenção do VE necessário para detectar alterações fotomorfogenética nos mutantes *fri* foi utilizada uma lâmpada incandescente (60W) sobre duas folhas de papel tipo celofane vermelho e um azul, enquanto para obter o V, necessário para detectar alterações nos mutantes *tri*, foi utilizada uma lâmpada fluorescente (20W) sobre duas folhas de papel tipo celofane vermelho. O experimento ocorreu em uma incubadora para B.O.D a uma temperatura de 25°C (Figura 10).

4.7 Avaliação do alongamento do hipocótilo e do entrenó do mutante *micro-au*

Foi medido diariamente por um período de 07 dias o alongamento do hipocótilo de uma plântula do mutante *micro-aub* bem como o primeiro entrenó de uma planta deste genótipo. Neste experimento foi utilizado um paquímetro.

4.8 Teste da capacidade de regeneração *in vitro*

4.8.1 Cultivo *in vitro*

Sementes de micro-mutantes fotomorfogenéticos, *micro-Msk* e *Micro-Tom* foram desinfestadas com álcool 95% por 30 segundos e transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio 50% por 15 minutos. Posteriormente as sementes foram lavadas por três vezes com água destilada estéril para que pudessem ser postas para germinar no escuro em placas de Petri contendo meio MS 1/2. Após quatro dias, as sementes foram transferidas para a luz branca. As sementes germinadas foram também transferidas para frascos tipo magenta a fim de se obter plantas para o teste de regeneração. Este material foi colocado em sala de

crescimento por, pelo menos, quatro semanas, a uma temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas.

4.8.2 Teste de regeneração

Após o cultivo das plantas *in vitro*, explantes foram retirados da raiz, caule e folha e inoculados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com 5µM de BA. Sob luz branca, ficaram expostos explantes de micro-mutantes *au*, *hp*, *atv* e *lp*, explantes de micro-MsK e MT. Sob V e VE ficaram expostos explantes de micro-MsK e MT.

A exposição dos explantes à luz branca ocorreu em uma sala de crescimento a uma temperatura de 25°C e fotoperíodo de 16 horas por 30 dias, enquanto explantes submetidos ao V e VE ficaram no interior de uma incubadora também a 25°C e fotoperíodo de 16 horas por 30 dias. Para a obtenção do VE, foi utilizada uma lâmpada incandescente (60W) sobre duas folhas de papel tipo celofane vermelho e uma azul, enquanto para obter o V, foi utilizada uma lâmpada fluorescente (20W) sobre duas folhas de papel tipo celofane vermelho (Figura 10).

A metodologia descrita neste item e no item 4.6.1 foi também utilizada para o teste da presença do locus *Rg1* durante a triagem para o micro-MsK. Nesta etapa, foi observado o aspecto esverdeado de calos formados a partir das raízes deste genótipo sob luz branca.

Figura 9 - Esquema de cruzamento e seleção de genótipos. Após o cruzamento entre MT (vasos de 150 ml) e o parental mutante (vasos de 20L), a geração F1 ainda foi cultivada em vasos maiores, devido a heterozigozidade dos genes de nanismos presentes em MT. Em F2, as plantas foram semeadas em bandejas a fim de selecionar apenas micro-mutantes (m/m), os quais puderam ser cultivados em vasos menores. O retrocruzamento de F1 com MT originou plantas F1BC1 heterozigotas (+/+), (+/m), e a obtenção dos micro-mutantes ocorreu através da autofecundação em F1BC1. O sinal de (+/+) equivale aos alelos não mutados de MT, e (m/m) às mutações fotomorfogênicas em homozigose. A heterozigose está representada por (+/m)

Figura 10 - Utilização de filtro amarelo em B.O.D. para triagem do mutante *micro-hp* (esquerda) e tratamento com comprimentos de onda do (V) e vermelho-extremo (VE), também em incubadora para B.O.D. (direita)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção de micro-mutantes fotomorfogénéticos

Durante os cruzamentos realizados entre a cultivar Micro-Tom e os mutantes fotomorfogénéticos, a triagem para plantas de porte pequeno, e ao mesmo tempo carregando a mutação, resultou na obtenção de micro-mutantes fotomorfogénéticos.

Considerando os diferentes fenótipos dos mutantes, nem todos permitiram facilmente que fossem realizadas as triagens. Os genótipos *au*, *hp*, *lp* e *atv* conferem características distinguíveis na planta, podendo ser selecionadas com relativa facilidade. O mutante *au* apresenta características fenotípicas de plantas cloróticas e estioladas (Terry & Kendrick, 1996), sendo de fácil identificação, enquanto mutantes com superexpressão de fitocromo (*lp*, *hp* e *atv*) possuem coloração verde escura da folhagem, do caule e dos frutos (Kendrick, et al., 1997), não sendo um processo tão fácil como ocorre em *au* (Figura 11). No momento da triagem para os micro-mutantes *fri* (Van Tuinen et al., 1995a) e *tri* (Van Tuinen et al., 1995b), os quais foram submetidos aos comprimentos de onda do V e VE, respectivamente, a tentativa de se observar um maior alongamento do hipocótilo para estes mutantes foi dificultada, pois este aspecto esperado não se apresentou evidente tanto para os mutantes parentais quanto para os micro-mutantes. O insucesso na seleção destes dois genótipos pode ser devido à utilização de filtros não suficientes para fornecer os comprimentos de onda adequados do V e VE, sendo necessária a tentativa de uso de outros tipos de filtros.

O mutante micro-*au*, mesmo sob luz branca, apresentou um estiolamento proeminente do caule (Figura 12) e do hipocótilo (Figura 13) comparado ao do MT. Este estiolamento também será observado provavelmente na obtenção das

gerações seguintes a obtida devido à deficiência do cromóforo para todos os tipos de fitocromo. Este aspecto dificulta a obtenção de plantas de *au* em porte tão pequeno quanto ao do MT. Medindo-se diariamente o hipocótilo e o primeiro entrenó do caule de plantas de MT e micro-*au*, foi possível observar um acelerado alongamento destes tecidos em micro-*au*, comparados aos do MT (Figura 14). Koornneef et al. (1985) observaram que as taxas de alongamento do hipocótilo dos mutantes *au* e do tipo selvagem são similares quando crescidos sob VE e diferentes sob os comprimentos de onda do azul e V. Estes resultados indicam que o alongamento do hipocótilo nestes mutantes sob luz branca é devido à deficiência no acúmulo de fitocromo. Além da proeminência no alongamento do hipocótilo, assim como observado no parental *au*, os micro-mutantes *au* também apresentam muito pouco acúmulo de pigmentos no caule, folha e frutos imaturos. Porém, na maturação do fruto, a deficiência no acúmulo de fitocromo parece não afetar severamente a síntese de licopeno, pois este pigmento é acumulado normalmente. Alba et al. (2000), verificaram o acúmulo de licopeno no fruto após tratamentos com V e VE, e relataram que maiores acúmulos ocorreram para o V, sugerindo a participação do fitocromo na síntese deste carotenóide. Deste modo, a visualização do acúmulo normal de licopeno em frutos de micro-*au* poderá ser diferente quando analisado quantitativamente.

A proximidade fenotípica observada entre os mutantes parentais que superexpressam o fitocromo e seus correspondentes em porte pequeno apresentou-se mais evidente para os micro-mutantes *atv*. Assim como Rick et al. (1968) descreveram o mutante parental *atv*, foi possível observar no mutante micro-*atv* um acúmulo de antocianina no hipocótilo (Figura 15), nas nervuras das folhas (Figura 16) e no caule (Figura 17), o que facilitou a triagem deste mutante em um estágio bem jovem da planta. Também no fruto ocorre maior acúmulo de clorofila (Figura 18).

Para a triagem dos mutantes micro-*hp*, foi utilizada uma incubadora (Figura 10) contendo um filtro amarelo sob luz branca. Nestas condições, as plantas de micro-*hp* acumularam antocianina na raiz e no caule (Figura 19), aspecto não observado para plantas de MT. Esta forma eficiente de triagem para os mutantes *hp* sob o comprimento de onda do amarelo, descrita por Moshizuki & Kamimura

(1985), os quais descreveram o acúmulo de antocianina apenas no hipocótilo destes mutantes, promoveu nos micro-mutantes *hp* o acúmulo de antocianina na raiz, além do hipocótilo, comparado ao MT. Após a triagem sob o amarelo, este comprimento de onda resultou na debilitação do micro-*hp*, o que dificultou o transplante da caixa gerbox para os vasos. O estabelecimento das plantas de micro-*hp* em vaso foi possível apenas quando o cultivo sob o amarelo ocorreu *in vitro*, processo utilizado para o teste de regeneração descrito no item 4.6.1.

A triagem para mutantes superexpressando o fitocromo foi dificultada a partir de folhas, devido às folhas do MT também possuírem pigmentação verde-escura. Portanto, a característica mais evidente tanto para as plantas do micro-mutante *hp* quanto para o micro-mutante *lp* foi observada nos frutos imaturos (Figuras 20 e 21), os quais adquirem uma coloração verde-escura comparada a do MT, embora esta característica seja mais nítida nas plantas parentais contendo as mutações fotomorfogenéticas.

Apesar da presença dos genes que conferem à cultivar MT o porte pequeno, a transferência das mutações fotomorfogenéticas presentes em tomateiro para a cultivar MT pouco afetou o aspecto promovido pelas mutações. Além disso, observações realizadas em outra cultivar de tomateiro que também confere o nanismo à planta (Tiny Tim), sugerem que o MT seja deficiente no acúmulo de brassinoesteróide, pois a cultivar miniatura Tiny Tim possui a mutação *dwarf* (*d/d*), deficiente na codificação de uma enzima da via biossintética de brassinoesteróide (Bishop et al., 1999). O suporte para esta sugestão foi feito quando MT foi cruzado com Tiny Tim, e as plantas F1 obtidas permaneceram anãs. Logo, plantas MT também possuem os alelos não funcionais (*d/d*). Porém, o efeito da mutação em brassinoesteróide presente em MT não é severo, pois uma das características deste hormônio é promover o alongamento do caule, e ao obter plantas micro-*au* foi observado um intenso alongamento do caule deste mutante, sugerindo a pouca interferência da deficiência em brassinoesteróide na cultivar MT durante a obtenção do micro-*au* e dos outros micro-mutantes fotomorfogenéticos.

Figura 11 - Plântulas de *micro-au* (F2). A triagem é facilitada devido ao aspecto clorótico deste mutante

Figura 12 - Alongamento acentuado do caule do mutante *micro-au* (BC1F2) comparado ao do MT (Micro-Tom). A ponteira azul tem 7 cm

Figura 13 - Alongamento do hipocótilo do mutante *micro-au* comparado ao do MT e ao mutante *au* parental. A moeda possui 2,5 cm de diâmetro

Figura 14 - Variação no comprimento do hipocótilo (acima) e do entrenó (abaixo) de plantas MT e *micro-au*

Figura 15 - Acúmulo de antocianina no hipocótilo do mutante *micro-atv* comparado ao do *micro-au* (esquerda) e ao do MT (direita). O estiolamento do hipocótilo em plantas *micro-au* é evidente. Este aspecto é observado mesmo na presença de luz branca

Figura 16 - Alta pigmentação de antocianina nas nervuras da folha de *micro-atv* (F3) comparada à do MT (Micro-Tom). Note que folhas de MT possuem coloração-verde escura, a qual dificulta a triagem para mutantes superexpressando o fitocromo

Figura 17 - Mutante *micro-atv* (direita) apresentando acúmulo de antocianina no caule. Este pigmento é pouco acumulado no caule do MT (esquerda)

Figura 18 - Alta pigmentação do fruto de *micro-atv*(F3) comparada à do MT (Micro-Tom).

Figura 19 - Acúmulo de antocianina na raiz e no caule do mutante *micro-hp* (BC1F2) e *hp* parental sob filtro amarelo. Este pigmento é pouco acumulado em plantas MT (Micro-Tom) nas mesmas condições.

Figura 20 - Alta pigmentação do fruto de *micro-hp* (F3) comparada à do MT (Micro-Tom)

Figura 21 - Alta pigmentação do fruto de *micro-lp* (F3) comparada à do MT (Micro-Tom). A moeda possui 2,5 cm de diâmetro

5.2 Obtenção do micro-MsK

A triagem para plantas micro-MsK contendo a alta capacidade organogenética foi feita utilizando o fruto amarelo como marcador morfológico (Figura 22), pois o locus de regeneração *Rg1* e a mutação *yellow flesh (r)*, a qual confere ao fruto cor amarela, estão ligados no mesmo cromossomo 3 do tomateiro (Figura 6). Esses resultados foram confirmados com teste de regeneração *in vitro*. Considerando que plantas de *Lycopersicon esculentum* (MT) não regeneram a partir de raiz, foi possível observar calos esverdeados de raiz de micro-MsK, característica não observada para MT (Figura 23). As plantas cujos explantes radiculares apresentaram calos esverdeados foram enraizadas novamente em meio de cultura e posteriormente transplantadas para vasos de 150ml. A utilização de BAP no processo de triagem ocorreu em função do alto custo do hormônio zeatina. Embora a obtenção de gemas seja favorecida com o uso de zeatina (Peres *et al.*, 2001), o objetivo desta etapa foi somente detectar a presença do locus *Rg1*. Além disso, a intensa ramificação do caule de plantas de micro-MsK observada ao longo das gerações, sugere que esta resposta seja mediada pelo locus *Rg1*, tornando-a mais uma ferramenta no momento da triagem deste genótipo (Figura 24).

Considerando as ramificações laterais na planta como resultado da baixa dominância apical e conseqüente atividade das citocininas, em conjunto com o clássico trabalho realizado por Skoog e Miller, (1965), no qual o balanço entre auxina e citocinina favorável à citocinina formou caules a partir da cultura de calos de tabaco *in vitro*, as intensas ramificações observadas nos caules de micro-MsK sugerem o *Rg1* como mediador das proporções destes dois hormônios favorável a citocinina. Além disso, foi observado no presente trabalho um grande número de gemas formadas *in vitro* a partir de explantes caulinares de micro-MsK (Figura 34), o que será discutido no item 5.4.4.

Figura 22 - O fruto amarelo foi utilizado como marcador morfológico durante a triagem para micro-MsK. O parental Micro-Tom (MT) não contém *rr* e *Rg1*

Figura 24 - Aumento no número de ramificações em plantas de micro-MsK. Este aspecto pode ser provocado pela expressão do locus *Rg1*

Figura 23 - Calos não esverdeados de MT (esquerda) e calos esverdeados de tomateiro (direita) contendo o locus *Rg1*. As raízes de ambos os genótipos foram cultivadas em meio contendo 5 μ M de BAP

5.3 Obtenção das gerações

5.3.1 Gerações de micro-mutantes fotomorfológicos

A partir dos cruzamentos realizados entre os mutantes fotomorfológicos e o parental Micro-Tom (Figura 25), as gerações alcançadas para os micro-mutantes foram: *micro-au* (BC2F2 e BC1F3), *micro-hp* (BC2, BC1F3 e F3), *micro-lp* e *micro-atv* (F3BC1, BC1F2 e F4), e *fri* e *tri* (F3 e BC1F3).

Figura 25 - Gerações obtidas após os cruzamentos entre a cultivar Micro-Tom e os mutantes fotomorfológicos

5.3.2 Gerações de micro-MsK

A partir dos cruzamentos realizados entre a cultivar MsK e o parental Micro-Tom (Figura 26), as gerações alcançadas foram F4BC1, BC3F2, F3BC1 e F5.

Figura 26 - Gerações obtidas após os cruzamentos entre a cultivar Micro-Tom e a cultivar MsK

5.4 Teste de regeneração *in vitro*

Entende-se por diferenciação a expressão seletiva de genes, a qual pode ser evidenciada pela mudança de cor do explante, formação de novos tipos celulares, tecidos e órgãos. Deste modo, para os tratamentos com explantes radiculares foram considerados diferenciados calos que apresentaram aspecto escurecido. Além disso, trabalhos prévios evidenciaram que calos apresentando este aspecto regeneraram (Peres, 2001).

5.4.1 Efeito do V e VE na regeneração de raízes de micro-MsK

Sob os comprimentos de onda do vermelho (V) e do vermelho-extremo (VE) foram observados os aspectos regenerantes ou não dos calos formados a partir de explantes radiculares do micro-MsK, portando o locus *Rg1*, e do controle MT. Após 30 dias sob V, os calos do micro-MsK apresentaram-se diferenciados, enquanto sob o comprimento de onda do VE não foi observada nenhuma diferenciação. Para o MT, os calos permaneceram indiferenciados tanto no V quanto no VE (Figura 27). Contudo, a ausência do fitocromo na forma ativa, promovida pelo VE, e o aspecto regenerante sob V, sugere a participação do fitocromo como mediador da atividade do locus *Rg1*, pois sob VE os calos formados a partir das raízes de MsK apresentaram-se indiferenciados. Tendo o tomateiro baixa competência para regeneração a partir de explantes radiculares (Peres et al., 2001) e a participação do fitocromo na regeneração de raízes de micro-MsK sugere-se a interação entre fitocromo e *Rg1* como um fator promotor de alta competência para regeneração de raízes de micro-MsK. Assim, caules e folhas de genótipos de tomateiro não carregando o *Rg1* podem formar gemas devido à interação entre fitocromo na forma ativa e um outro fator de regeneração.

5.4.2 Efeito das mutações fotomorfogênicas e do locus *Rg1* na capacidade de regeneração de raízes *in vitro* sob luz branca

Foi observado nesta etapa o aspecto regenerante ou não dos calos formados a partir dos explantes retirados das raízes dos micro-mutantes fotomorfogênicos e do micro-MsK, bem como do controle MT sob luz branca, durante 30 dias.

Após trinta dias da inoculação dos explantes radiculares em meio de cultura sob luz branca, os calos dos micro-mutantes fotomorfogênicos *hp*, *atv* e *lp*, os quais superexpressam o fitocromo, e do micro-MsK, apresentaram-se diferenciados quando comparados àqueles dos mutantes micro-*au*, deficientes para todos os tipos de fitocromo, e àqueles do controle MT. As raízes foram consideradas regenerantes quando os calos formados mostraram-se semelhantes

aos calos do micro-MsK, o qual carrega o locus de alta capacidade de regeneração. Desta forma, os calos apresentando um aspecto regenerante tornaram-se mais escuros, enquanto os calos não regenerantes permaneceram pouco diferenciados e sem escurecimento (Figura 28). Os aspectos regenerantes apresentados para os micro-mutantes *hp*, *atv* e *lp* sugerem que estes mutantes podem formar gemas a partir de raízes na presença de zeatina, já que esta resposta foi observada no parental MsK (Peres *et al.*, 2001). Outro aspecto interessante observado para o mutante micro-*atv* foi a coloração bastante esverdeada de suas raízes durante o cultivo deste genótipo *in vitro* (Figura 29). O acúmulo de clorofila e a diferenciação dos cloroplastos são conhecidos efeitos das citocininas (Davies, 1995). Deste modo, a superexpressão do fitocromo e/ou o efeito desta no acúmulo de citocininas pode ser um fator de indução na regeneração de raízes, tornando os tecidos com alta competência para regeneração.

A baixa competência para regeneração observada a partir de raízes de mutantes micro-*au* e do parental MT, bem como a alta competência observada para o micro-MsK e para os mutantes que superexpressam o fitocromo, sugerem a necessidade do fitocromo de um fator de regeneração na aquisição de competência para regeneração a partir de explantes radiculares. Deste modo, a superexpressão do fitocromo pode ser um promotor da expressão de um fator de regeneração de raízes de tomateiro.

5.4.3 Efeito do V e VE na capacidade de regeneração *in vitro* de explantes caulinares e foliares do MT e micro-MsK

A fim de verificar o efeito do V e VE na capacidade de regeneração de explantes caulinares e foliares de MT e micro-MsK, estes tecidos ficaram expostos a estes comprimentos de onda durante 30 dias em MS mais 5µM de BA, para que fosse feita a contagem do número de gemas formadas. Os maiores índices de regeneração foram observados sob V, tanto para o caule quanto para folha do micro-MsK e MT. O efeito inibitório do VE na regeneração pôde ser observado também no caule e na folha de ambos os genótipos (Figuras 30 e 31). Estes

resultados sugerem a participação da forma ativa do fitocromo na regeneração a partir de caules e folhas, devido ao efeito reverso dos comprimentos de onda do V e VE neste processo. O papel do fitocromo na capacidade de regeneração foi relatado por Lercari et al. (1999) avaliando-se o efeito do V e VE na regeneração de segmentos basal, intermediário e apical do hipocótilo do mutante *au*, deficiente em todos os tipos de fitocromo. Para este mutante, nenhuma formação significativa de gemas foi observada sob V e VE. Em mutantes de tomateiro deficientes no acúmulo de phyA pré-cultivados sob VE, Bertran & Lercari (2000) observaram baixa capacidade de regeneração para todos os segmentos do hipocótilo. O mesmo pôde ser observado para os mutantes *tri*, deficientes no acúmulo de phyB1, quando pré-cultivados sob V. Contudo, a capacidade de formação de gemas a partir de segmentos de hipocótilos de tomateiro pode ser mediada, pelo menos, por duas formas distintas de fitocromos, phyA e phyB1.

5.4.4 Efeito das mutações fotomorfogenéticas e do locus *Rg1* na capacidade de regeneração *in vitro* de explantes caulinares e foliares sob luz branca

Explantes caulinares e foliares dos micro-mutantes fotomorfogenéticos, do micro-MsK e do controle MT ficaram expostos à luz branca durante 30 dias para verificar o efeito das mutações e do locus *Rg1* na capacidade de regeneração destes tecidos. Dentre os mutantes fotomorfogenéticos, aqueles que superexpressam o fitocromo apresentaram maiores números de gemas formadas tanto para explantes caulinares quanto para foliares. Porém, o mutante micro-*hp* apresentou baixa capacidade de regeneração a partir de explantes caulinares, e juntamente com micro-*lp* apresentou alta capacidade de regeneração a partir de explantes foliares (Figuras 32 e 33), sugerindo que o efeito marcante da mutação nestes dois genótipos esteja na folha, enquanto para os micro-mutantes *atv* o efeito da mutação parece estar presente no caule, onde aparecem os maiores índices de regeneração. Por outro lado, a insuficiência na formação de gemas, observadas a partir de explantes caulinares do mutante micro-*au*, deficiente para todos os tipos de fitocromo, reflete a necessidade do fitocromo na regeneração a partir de caules. O efeito da mutação no micro-*au* durante a regeneração de

folhas é menos severo, tendo como resultado a formação de gemas, porém muito pouca. A partir de explantes retirados de hipocótilos de mutantes *au* cultivados com $10\mu\text{M.L}^{-1}$ de BA e $1\mu\text{M.L}^{-1}$ de AIA, Tyburski & Tretyn (1999) observaram que poucas gemas foram formadas sob contínua luz branca. Resultados semelhantes foram observados por estes autores durante a exposição dos explantes de *au* ao V, enquanto que para *hp* o maior número de gemas formadas foram observadas sob luz branca. A insuficiência na formação de gemas a partir de hipocótilos de mutantes *au* sob V também foi observada por Lercari et al. (1999). Entretanto, a baixa competência para regeneração dos tecidos do mutante *au* indica que o fitocromo é um importante modulador deste processo. Os resultados adicionais sugerem que o fitocromo fornece uma função crucial na capacidade de regeneração de tecidos de tomateiro.

Para o micro-MsK, valores elevados na formação de gemas foram observados a partir de explantes caulinares (Figura 34), e menores valores ocorreram para a folha, sugerindo maior expressão do locus *Rg1* no caule, o que pode vir de encontro com a intensa ramificação observada nos caules deste genótipo (Figura 24).

A somatória das observações feitas no presente trabalho sugere a presença de um fator de alta capacidade regenerativa tanto nos materiais contendo o locus *Rg1* quanto nos mutantes que superexpressam o fitocromo. Desse modo, os efeitos das mutações fotomorfogênicas podem promover, em uma via de sinalização, a expressão de fatores que induzem a capacidade de regeneração. Alternativamente, os fatores de regeneração podem promover a alta capacidade regenerativa através de mutações fotomorfogênicas. A criação de duplos mutantes *Rg1 hp*, *Rg1 atv*, *Rg1 lp* bem como *Rg1 au* poderiam responder muitas destas questões.

Figura 27 - Aspectos dos calos formados a partir de raízes de MT e Msk sob os comprimentos de onda do V e VE. A. Sob V, houve pouca diferenciação dos calos de MT devido à ausência de um fator promotor de regeneração por raízes. Os calos permanecem sem escurecimento. B. Sob V, calos de micro-Msk apresentam-se escurecidos, sugerindo o efeito do V na indução do locus *Rg1*. C, D. Os comprimentos de onda do VE inibe a formação de calos diferenciados em MT e Msk

Figura 28 - Aspectos dos calos formados a partir de raízes de mutantes fotomorfogênicos e MT sob luz branca. A. Calos poucos diferenciados e sem escurecimento em MT, devido à ausência de um fator promotor de regeneração por raízes. B. A deficiência na síntese do fitocromo no mutante *micro-au* promove pouca diferenciação dos calos do mutante *micro-au*. C, D, E e F. Aspectos regenerantes dos calos dos mutantes fotomorfogênicos *hp*, *atv* e *lp*. A semelhança entre os calos destes mutantes e o do genótipo *micro-MsK*, o qual carrega o locus de alta capacidade de regeneração, sugere a superexpressão do fitocromo como um fator promotor da regeneração por raízes

Figura 29 - A superexpressão do fitocromo promove a coloração esverdeada nas raízes do micro-*atv* cultivado *in vitro*, enquanto esta resposta não é observada em MT

Figura 30 - Efeito do V e VE na formação de gemas a partir de explantes caulinares de micro-MsK e MT após 30 dias

Figura 31 - Efeito do V e VE na formação de gemas a partir de explantes foliares de micro-MsK e MT após 30 dias

Figura 32 - Efeito da luz branca (LB) na formação de gemas a partir de explantes caulinares de micro-mutantes fotomorfogenéticos, micro-MsK e MT após 30 dias

Figura 32 - Efeito da luz branca (LB) na formação de gemas a partir de explantes foliares de micro-mutantes fotomorfológicos, micro-MsK e MT após 30 dias

Figura 34 - Capacidade de formar gemas a partir explantes caulinares de MT e MsK em meio com BA sob luz branca. Em MT (esquerda) ocorre baixa capacidade de formar gemas, enquanto em micro-MsK (direita) um grande número de gemas foi formado devido à presença do locus *Rg1*

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- As alterações fotomorfogênicas dos mutantes parentais de tomateiro podem ser transferidas para a cultivar Micro-Tom, tornando-a uma ferramenta importante no estudo das respostas mediadas por fitocromos.
- A superexpressão do fitocromo promove a alta competência para regeneração de raiz caule e folha.
- O locus *Rg1* parece interagir com fitocromo no processo de regeneração.

Tem-se como perspectiva:

- A obtenção de duplos mutantes fotomorfogênicos-hormonais e fotomorfogênicos-*Rg1* a fim elucidar a interação entre fitocromo e hormônios vegetais bem como fitocromo e o locus *Rg1*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSE, P.; JASPERS, P.A.P.M.; BAKKER, J.A.; WESSELIUS, J.C.; HEERINGA, G.H.; KENDRICK, R.E.; KOONNEEF, M. Phytophysiology of a tomato mutant deficient in labile phytochrome. **Journal Plant Physiology**, v. 133. p, 436-440, 1988.
- ALBA, R.; PRATT-CORDONNIER, M. M.; PRATT, L. H. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. **Plant Physiology**, v. 132, p. 363-370, 2000.
- ASAMI, T.; MIN, Y.K.; NAGATA, N.; YAMAGISHI, K.; TAKATUTSUTO, S.; FUJIOKA, S.; MUROFUSHI, N.; YAMAGUSHI, I.; YOSHIDA, S. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. **Plant Physiology**, v. 123, p. 93-100, 2000.
- BECKER, T.W.; FOYER, C.; CABOCHE, M. Light-regulated expression of nitrate-reductase and nitrate-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient *aurea* mutant of tomato. **Planta**, v. 188, p. 39-47, 1992.
- BEHRINGER, F.J.; DAVIES, P.J.; REID, J.B. Genetics analysis of the role gibberellin in the red light inhibition of stem elongation in etiolated seedlings. **Plant Physiology**, v. 94, p. 432-439, 1990.
- BENSEN, R. J.; ZEEVAART, J. A. D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 9, p. 237-242, 1990.

- BERTRAM, L.; LERCARI, B. Phytochrome B1 control the acquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotyl. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 604-609, 2000.
- BISHOP, G.J.; KONCZ, C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. **Plant Cell**, v. 14, p. S97-S110, 2002.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T. M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; McCARTY, D. R.; TAYLOR, I. B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **Plant Journal**, v. 17, p. 427-431, 1999.
- CAMPELL, B.R.; BONNER, B.A. Evidence for phytochrome regulation of gibberellin A20 3 β -hydroxylation in shoots of dwarf (*lele*). *Pisum sativum* L. **Plant Physiology**, v. 82, p. 909-915, 1986.
- CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signal. **Planta**, v. 213, p. 700-707, 2001.
- CASAL, J.J.; SÁNCHEZ, R.A.; BOTTO, J.F. Modes of action of phytochromes. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 127-138, 1998.
- CHILDS, K.L.; PRATT, L.H.; MORGAN, P.W. Genetics regulation of development in *Sorghum bicolor*. VI. The *ma₃^R* allele results in abnormal phytochrome physiology. **Plant Physiology**, v. 97, p. 714-719, 1991.
- CHIN-ATKINS, A.N.; CRAIG, S.; HOCART, C.H.; DENNIS, D.S.; CHAUDHURY, A.M. Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis amp1* mutant correspond with de-etiolation response. **Planta**, v. 198, p. 549-556, 1996.

- CHORY, J.; REINECKE, D.; SIM, S.; WASHBURN, T.; BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis det* mutants may have an altered response to cytokinins. **Plant Physiology**, v. 104, p. 339-347, 1994.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis in vitro as a development process. **Horticultural Science**, v. 23, p. 515-519, 1988.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-12.
- DARBY, L.A. Isogenic lines of tomato fruit-colour mutants. **Horticultural Research**, v. 18, p. 73-84, 1978.
- ECONOMOU, A.S.; Read, P.E. Light treatment to improve efficiency of in vitro propagation systems, **Horticultural Science**, v. 22, p. 751-754, 1987.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A. A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5. p. 112-117, 2002.
- FARIA, R. T.; ILLG, R. D. Inheritance of *in vitro* plant regeneration ability in the tomato. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, p. 113-116, 1996.
- 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**, v 88, p. 774-779, 1988.
- FURUYA, M. Phytochromes: Their molecular species, gene families and functions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 617-645, 1993.

- GOESCHL, J.D.; PRATT, H.K.; BONNER, B.A. An effect of light on the production of ethylene and growth of the plumular portion of etiolated pea seedling. **Plant Physiology**, v. 42, p. 1077-1080, 1967.
- GOUD, K.V.; SHARMA, R. Retention of photoinduction of cytosolic enzymes in aurea mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, v. 105, p. 643-650, 1994.
- GOUD, K.V.; SHARMA, R.; KENDRICK, R.E.; FURUYA, M.; Photoregulation of phenylalanine ammonia-lyase is not correlated with anthocyanin induction in photomorphogenesis mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell Physiology**, v. 32, p. 1251-1258, 1991.
- HALLIDAY, K. J.; FANKHAUSER, C. Phytochrome-hormonal signaling networks. **New Phytologist**, v. 157, p. 449-463, 2003.
- HUGHES, K.W. In vitro ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture system. **Environmental and Experimental Botany**, v. 21, p. 281-288, 1981.
- JENSEN, P.J.; HANGARTER, R.P.; ESTELLE, M. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 116, p. 455-462, 1998.
- JORDAN, E.T.; HATFIELD, P.M.; HONDRED, D; TALON, M.; ZEEVAART, J. A. D.; VIERSTRA, R.D. Phytochrome A overproduction in transgenic tobacco. Correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue e attenuated gibberellin levels. **Plant Physiology**, v. 107, p. 797-805, 1995.
- KADKADE, P.; SEIBERT, M. Phytochrome-regulated organogenesis in lettuce tissue culture. **Nature**, v. 270, p. 49-50, 1977.

- KELLY, M.O.; BRADFORD, K. J. Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, v. 82, p. 713-717, 1986.
- KENDRICK, R.E.; KERCKHOFFS, L.H.; VAN TUINEN, A.; KOORNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 746-751, 1997.
- KENDRICK, R.E.; PETERS, J.L.; KERCKHOFFS, L.H.J.; VAN YUINEN, A.; KOORNNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Biochemical Society Symposia**, v. 60, p. 249-256. 1994.
- KENDRICK, R.E; KRONENBERG, G.H.M. (Ed.). **Photomorphogenesis in Plants**. 2.ed. Dordrecht: Academic Publishers, 1994. p. 601-628.
- KERCKHOFFS, L.H.J.; SENGERS, M.M.T.; KENDRICK, R.E. Growth analysis of wild-type and photomorphogenic mutant tomato plants. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 309-315, 1997c.
- KERCKHOFFS, L.H.; SCHREUDER, M.E.L.; VAN TUINEN, A.; KOORNEEF, M.; KENDRICK, R.E. Phytochrome control of anthocyanin biosynthesis in tomato seedlings: analysis using photomorphogenic mutants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 374-381, 1997.
- KERCKHOFFS, L.H.J.; VAN TUINEN, A.; HAUSER, B.A.; CORDONNIER-PRATT, M.M. NAGATANI, A.; KOORNNEEF, M.; PRATT, L.H.; KENDRICK, R.E. Molecular analysis of *tri*-mutants alleles in tomato indicates the Tri locus is the gene coding the apoprotein of phytochrome B1. **Planta**, v. 199, p. 152-157, 1996.
- KERCKHOFFS, L.H.J.; DE GROOT, N.A.M.A.; VAN TUINEN A.; SCHREUDER M.E.L.; NAGATANI, A.; KOORNNEEF M.; KENDRICK R.E. Physiological characterization of exaggerated-photoresponse mutants of tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 150, p. 578-587, 1997b.

- KERCKHOFFS, L.H.J.; KELMENSEN, P.M.; SCHREUDER M.E.L.; KENDRICK, C.I.; KENDRICK R.E.; HANHART, C.J.; KOORNNEEF, M.; PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M. Characterization of the gene encoding the apoprotein of phytochrome B2 in tomato, and identification of molecular lesions in two mutant alleles. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 901-907, 1999.
- KERR, E.A. Identification of high-pigment, hp, tomatoes in the seedling stage. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 100, p. 147-160, 1965.
- KNEE, E.M.; HANGARTER, R.P.; KNEE, M. Interactions of light and ethylene in hypocotyl hook maintenance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 108, p. 208-217, 2000.
- KOKA, C. V.; CERNY, R. E.; GARDNER, R. G.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; YOSCHIDA S.; CLOUSE, S. D. A putative role for the tomato genes *dumpy* and *curl-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. **Plant Physiology**, v. 122, p. 85-98, 2000.
- KOORNNEEF, M.; HANHART, C. J.; MARTINELLI, L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. **Theoretical Applied Genetics**, v. 74, p. 633-641, 1987.
- KOORNNEEF, M.; CONE, J.W.; DEKENS, R.G.; O'HERNE-ROBERS, E.G.; SPRUIT, C.J.P.; KENDRICK, R.E. Photomorphogenetic response of long-hypocotyl mutants of tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 120, p. 153-165. 1985.
- KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VEKERK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **Plant Journal**, v. 3, p. 131-141, 1993.
- KRAEPIEL, Y.; MIGINIAC, E. Photomorphogenesis and phytohormones. **Plant, Cell and Environment**, v. 20, p. 807-812, 1997.

- KRAEPIEL, Y.; MARREC, K.; SOTTA, B.; CABOCHE, M.; MIGINIAC, E. In vitro morphogenic characteristics of phytochrome mutants in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high indole-3-acetic-acid levels. **Planta**, v. 197, p. 142-146, 1995.
- KRAEPIEL, Y.; ROUSSELIN, P.; SOTTA, B.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; CABOCHE, M.; MIGINIAC, E. Analysis of phytochrome and ABA-deficient mutants suggest that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana Plumbaginifolia*. **Plant Journal**, v. 6, p. 665-672, 1994.
- KUT, S.A.; EVANS, D.A. Plant regeneration from culture leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. **In Vitro Cellular and Development biology. Plant**, v. 18, p. 593-598, 1982.
- LAGARIAS, J.C.; LAGARIAS, D.M. Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 86, p. 5778-5780, 1989.
- LERCARI, B.; TOGNOMI, F.; ANSELMO, G.; CHAPEL, D. Photocontrol of *in vitro* bud differentiation in *Saintpaulia ionantha* leaves and *Lycopersicon esculentum* cotyledons. **Physiologia. Plantarum**, v. 67, p. 340-344, 1986.
- LERCARI, B.; MSCATELLI, S.; GHIRARD, E.; NICEFORO, R. Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-growth hypocotyls of tomato. **Plant Science**, v. 140, p. 65-76, 1999.
- LI, J.; NAGPAL, P.; VITART, V.; MCMORRIS, T.C.; CHORY, J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. **Science**, v. 272, p. 398-401, 1996.
- LINO, M. Action of red light on indole-3-acetic-acid status and growth in coleoptiles of etiolated maize seedlings. **Planta**, v. 156, p. 21-32, 1982.

- LIPUCCI DI PAOLA, M.; COLLINA GRENCI, F.; CALTAVUTURO, L.; TOGNOMI, F.; LERCARI, B. A phytochrome mutant from tissue culture of tomato. **Advances in Horticultural Science**, v. 2, p. 30-32, 1988.
- LÓPEZ-JUEZ, E.; KOBAYASHI, M.; SAKURAI, A.; KAMIYA, Y.; KENDRICK, R.E. Phytochrome, gibberellins and hypocotyls growth. **Plant Physiology**, v. 107, p. 131-140, 1995.
- LOPEZ-JUEZ, E.; NAGATANI, A.; BJURMEIJER, W.F.; PETERS, J.L.; FURUYA, M.; KENDRICK, R.E.; WESSELIUS, J.C. Response of light-growth wild-type and *aurea* mutant tomato plants to end-of-day far-red light. **Journal Photochemistry and Photobiology**, v. 4, p. 391-405, 1990.
- MANDOLI, D.F.; BRIGGS, W.R. Fiber optics in plants. **Scientific American**, v. 251, p. 90-98, 1984.
- MARCENARO, S.; VOYATZI, C.; LERCARI, B. Photocontrol of in vitro bud regeneration: A comparative study of the interaction between light and IAA in a wild type and an *aurea* mutant of *Lycopersicon esculentum*. **Physiologia Plantarum**, v. 94-101, p. 329-333, 1994.
- MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, v. 12, p. 1465-1472, 1997.
- MOCHIZUKI, T.; KAMIMURA, S. Photosensitive method for selection of hp at the cotyledon stage. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v. 35, p. 12-13, 1985.
- MOLLER, S.G.; INGLES, P.J.; WHITELAM, G.C. The cell biology of phytochrome signaling. **New Phytologist**, v. 154, p. 553, 2002.

- MULEO, R.; MORINI, S. Effect of light quality on regeneration from callus of *Actinidia deliciosa*. **Acta Horticulturae**, v. 280, p. 155-158. 1990.
- NEFF, M.M.; NGUYEN, S.M.; MALANCHARUVIL, E.J.; FUJIOKA, S.; NOGUCHI, T.; SETO H.; TSUBUKI, M.; HONDA, T.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. BAS1: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science do USA**, v. 96, p. 15316-15323, 1999.
- PARKS, B.M.; JONES, A.M.; ADAMSE, P.; KOORNNEEF, M.; KENDRICK, R.E.; QUAIL, P.H. The *aurea* mutant of tomato is deficient in spectrophotometrically and immunologically detectable phytochrome. **Plant Molecular Biology**, v. 9, p. 97-107, 1987.
- PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 44-48, 2002.
- PERES, L. E. P.; MORGANTE, P. G.; VAN SLUYS, MA; KRAUS, J. E.; VECHI, C. Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 37-44, 2001.
- PETERS, J.L.; SCHREUDER, M.E.L.; VERDIUM, S.J.W.; KENDRICK, R.E. Physiological characterization of a high-pigment mutant of tomato. **Photochemistry and Photobiology**, v. 56, p. 75-82, 1992.
- PETERS, J.L.; VAN TUINEN, A.; ADAMSE, P.; KENDRICK, R.E.; KOORNNEEF, M. High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. **Journal Plant Physiology**, 134, p. 661-666, 1989.

- PRATT, L.H.; CORDONNIER-PRATT, M.M.; KELMENSEN, P.M.; LAZAROVA, G.I.; KUBOTA, T.; ALBA, R.M. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicon* L.). **Plant, Cell Environment**, v. 20, p. 672-677, 1997.
- QUAIL, P.H.; BOYLAN, M.T.; PARKS, B.M.; SHORT, T.W.; XU, Y.; WAGNER, D. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. **Science**, v. 268 p. 675-680, 1995.
- REED, J. W.; FOSTER, K.R.; MORGAN, P.W.; CHORY, J. Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 112, p. 337-342, 1996.
- RICK, C.M. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. **Hilgardia**, v. 42, p. 493-510, 1974.
- RICK, C.M.; REEVES, A.F.; ZOBEL, R.W. Inheritance and linkage relations of four new mutants. **Tomato Genetics Cooperative Report**, v. 18, p. 34-35, 1968.
- ROMANO, C. P.; ROBSON P. R. H.; SMITH, H.; ESTELLE, M.; KLEE, H. Transgene-mediated auxin overproduction in *Arabidopsis*: hypocotyl elongation phenotype and interactions with the *hy6-1* hypocotyl elongation and *axr1* auxin-resistant mutants. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 1071-1083, 1995.
- SEIBERT, M.; WETHERBEE, P.J.; JOB, D.D. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. **Plant Physiology**, v. 56, p. 130-139, 1975.
- SEYEDI, M.; SELSTAM, E.; TIMKO, M.P.; SUNDQVIST, C. The cytokinin 2-isopentenyladenine causes partial reversion to skotomorphogenesis and induces formation of prolamellar bodies and protochlorophyllide 657 in the *lhp1* mutant of pea. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 261-272, 2001.

- SHARROCK, R.A.; QUAIL P. H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. **Genes & Development**, v 3, p. 1745-1757, 1989.
- SHERWIN, J.E.; FURUYA, M. A red-far red reversible effect on uptake of exogenous indole-acetic acid in etiolated rice coleoptiles. **Plant Physiology**, v. 51, p. 295-298, 1973.
- SHINOMURA, T.; NAGATANI, A.; HANZAWA, H.; KUBOTA, M.; WATANABE, M.; FURUYA, M. Action spectra for phytochrome A - and phytochrome B - specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 93, p. 8129-8133, 1996.
- SKOOG, FI; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.
- STEINDLER, C.; MATTEUCCI, A.; SESSA, G.; WEIMAR, T.; OHGISHI, M.; AOYAMA, T.; MORELLI, G.; RUBERTI, I. Shade avoidance response are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. **Development**, v. 126, p. 4235-4245.
- STOMMEL, J.R.; SINDENS, S.L. Genotypic differences en shoot-forming capacity of cultured leaf of *Lycopersicon hirsutum*. **Hortscience**, v. 26, p. 1317-1320, 1991.
- SYMONS, G.M.; SCHULTZ, L.; KERCKHOFFS, L.H.; DAVIES, N.W.; GREGORY, D.; REID J.B. Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 311-319, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer, 1998, 792p.

- TANKSLEY, S. D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J. P.; VICENT, M. C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T. M.; GOVANNONI, J. J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; RÖDER, M. S.; WING, R. A.; WU, M.; YONG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v. 132, p. 1141-1160, 1992.
- TERRY, M.J.; KENDRICK, R.E. The *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21681-21686, 1996.
- THOMPSON, A.; HEPLER, R.W.; KERR, E.A. Clarification of the inheritance of high total carotenoid pigments in the tomato. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, v. 81, p. 434-442, 1962.
- THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (Ed.) **Plant Cell and Tissue Culture**. London: Kluwer Academic, 1994, p. 17-36.
- TOYOMASU, T.; YAMANE, H.; MUROFUSHI, N.; INOUE, Y. Effect of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. **Plant Cell Physiology**, v. 35, p. 127-129, 1994.
- TOYOMASU, T.; TSUJI, H.; YAMANE, H.; NAKAYAMA, M.; YAMAGUCHI, I.; MUROFUSHI, N.; TAKAHASHI, N.; INOUE, Y. Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 85-90, 1993.
- TYBURSKI, J.; TRETYN, A. Organogenetic response of photomorphogenic mutants of tomato. **Journal Plant Physiology**, v. 155, p. 568-575, 1999.
- VAN TUINEN, A. CORDONNIER-PRATT, M.M.; PRATT, L.H.; VERKERK, R.; ZABEL, P.; KOORNNEEF, M. The mapping of phytochrome genes and photomorphogenic mutants of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 115-122, 1997.

- VAN TUINEN, A.; KERCKHOFFS, L.H.J.; NAGATANI, A.; KENDRICK, RE.; KOORNNEEF, M.
A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. **Plant Physiology**, v. 108, p.939-947, 1995b.
- VAN TUINEN, A.; KERCKHOFFS, L.H.J.; NAGATANI, A.; KENDRICK RE.; KOORNNEEF, M.
Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficiente mutants of tomato. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 133-141, 1995a.
- VAN TUINEN, A.; KERCKHOFFS, L.H.J.; NAGATANI, A.; KENDRICK RE.; KOORNNEEF, M.
Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficiente mutants of tomato. **Molecular and General Genetics**, v. 246, p. 133-141, 1995a.
- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P. Mutations affecting anthocyanin synthesis in tomato. I. Genetics, histology, and biochemistry. **Hereditas**, v. 60, p. 317-346, 1968a.
- VON WETTSTEIN-KNOWLES, P. Mutations affecting anthocyanin synthesis in tomato. II. Physiology. **Hereditas**, v. 61, p. 255-275, 1968b.
- WARD, H.B.; VANCE, B.D. Effects of monochromatic radiations on growth of *Pelargonium* callus tissue. **Journal of Experimental Botany**, v. 19, p. 119-124, 1968.
- WEIS, J.S.; JAFFE, M.J. Photoenhancement by blue light of organogenesis into tobacco pith cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 22, p. 171-176, 1969.
- WELLER, J.L.; ROSS, J.J.; REID, J.B. Gibberellins and phytochrome regulation of stem elongation in pea. **Planta**, v.192, p. 489-496, 1994.
- WHITELAM, G.C.; HARBERD, N.P. Action and function of family members revealed through the study of mutant and transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 94, p. 115-122, 1994.

- 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**, v. 270, p. 1807-1809, 1995.
- WING, R.A.; ZHANG, H.B.; TANKSLEY, S.D. Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of *jointless*. **Molecular and General Genetics**, v. 242, p. 681-688, 1994.
- YEN, H.C.; SHELTON, B.A.; HOWARD, L. R.; LEE, S.; VREBALOV, J. GIOVANNONI, J.J. The tomato high pigment (*hp*) locus to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 1069-1079, 1997.
- ZAMIR, D.; TANKSLEY, S. D. Tomato genome is comprised of fast-evolving, low-copy number sequences. **Molecular and General Genetics**, v. 213, p. 254-261, 1988.