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

Controle hormonal da defesa à herbivoria em tomateiro

Marcelo Lattarulo Campos

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

**Piracicaba
2009**

Marcelo Lattarulo Campos
Biólogo

Controle hormonal da defesa à herbivoria em tomateiro

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

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

Piracicaba
2009

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

Campos, Marcelo Lattarulo
Controle hormonal da defesa à herbivoria em tomateiro / Marcelo Lattarulo Campos . - -
Piracicaba, 2009.
117 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Artrópodes 2. Hormônios vegetais 3. Insetos fitófagos 4. Perdas agrícolas 5. Tomate
I. Título

CDD 635.642
C198c

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

Aos meus pais e ídolos,

Maria Teresa

&

Vamberto

DEDICO

A minha eterna companheira,

amiga e namorada,

Camila,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Segue aqui meu pequeno agradecimento, mas grandiosa e eterna admiração a todos aqueles que foram a alma deste trabalho.

Aos meus pais Maria Teresa e Vamberto, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em tudo e sendo meu porto seguro. Vocês dois são as pessoas que mais admiro na vida. Meu ETERNO obrigado.

A Camila, meu amor, aquela que mesmo longe estava sempre perto, tanto nos ótimos quanto nos maus momentos... Ah sim, muitas das plantas utilizadas neste trabalho foi ela quem plantou! AMO VOCÊ 147x tudo gatinha!

Ao Lázaro, por ser amigo, conselheiro, irmão, professor, guru espiritual, companheiro de casa de vegetação e orientador também! Obrigado por me ensinar a amar ainda mais a ciência. Admiro-te como pessoa e como profissional.

Ao Daniel Moura, pelas poucas, mas ótimas conversas e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Wilson Maluf, pelas técnicas que foram a base deste trabalho.

A minha avó Vitória, a bióloga *honoris causa*; aquela que mais me ensinou esses anos todos. Obrigado pelas maravilhosas conversas.

Ao Vladboy, Tozo e Pepe, irmãos de alma que sempre foram e serão a fonte de risadas e bom humor na minha vida.

A Fefe e Suko, irmãs de sangue, por estarem sempre comigo pro que der e vier.

A Sarah, que sabe como ninguém colocar a minha cabeça no lugar e sempre, sempre, sempre, sempre é um exemplo de vida. TE ADORO!

Ao Fabão, André e Márcio, primões e eternos amigos.

Ao Imailton, Ciro, Dan e Vinny, que mesmo de longe estavam ao meu lado, me acompanhando. Vocês são pessoas iluminadas!

A Fabiana, minha queridíssima amiga, companheira de idéias, risadas, saídas, dores, “Lost” etc, etc, etc. Você é maravilhosa!! Te curto muito “mulhé”!!!

Ao K-ju (“Tô Sussa...”) que vivenciou (com muitas risadas e alegrias) todos os pontos altos e baixos desses dois anos de trabalho! Valeu brother!!

Ao Ivan, que além de ser um grande companheiro é também um exemplo a ser seguido. Meu muito obrigado a você Magrão!!

Ao Fred e Evandro, pelos ótimos papos, risadas, desabafos e brincadeiras. Vocês dois são e sempre serão grandes amigos!

A todos do grupo de discussão de artigos, João Paulo, Rafa (ou seria Rapha? Raffa? Rrafha??), Giovani, Leo e Fred pelos maravilhosos momentos de inspiração.

A Lilian (Liloña), Tati (Tataka) e Mary por me encherem demais, mas por serem as pessoas mais amáveis e queridas do mundo.

Ao Roger, pelos vários momentos de descontrações e risadas! Só não agradeço as piadas... Eram muito ruins! Hehehehe!

Ao Tamps, Palms e Chuck, por serem como uma segunda família pra mim!

A Solizéte e Lú, os anjos da fisiologia e da fitotecnia. Adoro vocês!

Ao Prof. Murilo de Melo, pelos bons e descontraídos papos.

A todos os membros e ex-membros do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal: Clarissa, Simone, Ricardão, Fernandão, Juliana, Rúbia e Angélica.

Ao Tirolez, Miranda, Romeu e Cometa pela ampla ajuda na CV e laboratórios.

A todos do Laboratório de Fisiologia Pós-Colheita: Prof. Dr. Ricardo Kluge, Ivan, K-ju, Luiza, Dani Vitti, Baguiña, Tales etc.. etc.. etc... Vocês são maravilhosos.

No Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, meu muito obrigado a Thais, Katherine, Gaby, Malú, Cássia e, obviamente, Prof. Dr. Marcílio e Christina. Vocês todos são dotados de uma alegria contagiante!

Àqueles do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Lorena, Jupará e principalmente Celsão por terem me agüentado indo encher o saco todo dia por causa do Real Time e ao Prof. Dr. Antônio Figueira pelos reagentes e uso do equipamento.

A Fátima e ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, pelas lagartas de *Tuta* e ao Prof. Dr. Celso Omoto pelas lagartas de *Spodoptera*.

A Mônica pelas MARAVILHOSAS imagens de MEV, a Prof. Dr. Adriana e ao Prof. Dr. Kitajima pelo uso das dependências dos laboratórios e microscópios.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esse trabalho, mas que não tenho muito espaço para agradecer: Karlinha, Marcella, Paulo Henrique, Prit, K-juru, Wolvs, Ademir, Flávia, etc.. etc.. etc...

Por fim, mas muito importante, a FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

“A vida é feito andar de bicicleta: Se parar você cai.”

Trecho de *Sem Parar* – Gabriel o Pensador

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	23
LISTA DE ABREVIATURAS.....	25
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 DESENVOLVIMENTO.....	31
2.1 Revisão Bibliográfica.....	31
2.1.1 Importância econômica e perdas na cultura do tomateiro: Infestação por artrópodes herbívoros.....	31
2.1.2 Mecanismos naturais de defesa a herbivoria.....	32
2.1.3 A atuação dos hormônios na defesa: O papel do ácido jasmônico.....	34
2.1.3.1 Mutantes em ácido jasmônico.....	37
2.1.4 A cultivar Micro-Tom.....	38
2.2 Material e Métodos.....	39
2.2.1 Material vegetal.....	39
2.2.2 Tratamento com hormônios exógenos (Somente para <i>gib3</i> e <i>jai1-1</i>).....	41
2.2.3 Busca de mutantes candidatos.....	44
2.2.3.1 Quantificação de tricomas.....	44
2.2.3.2 Número de células epidérmicas.....	45
2.2.3.3 Quantificação de zingibereno.....	46
2.2.3.4 Quantificação de acil-açúcares.....	47
2.2.4 Duplos mutantes.....	48
2.2.4.1 Produção dos duplos mutantes.....	48
2.2.4.2 Seleção dos duplos mutantes.....	49
2.2.4.3 Parâmetros analisados.....	49
2.2.4.4 <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR).....	50
2.2.5 Testes de herbivoria.....	53
2.2.5.1 Teste com <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae).....	53
2.2.5.2 Teste com <i>Tuta absoluta</i> Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae).....	55

2.2.6 Análise estatística.....	55
2.3 Resultados.....	56
2.3.1 Quantificação de tricomas de baixa densidade em diferentes mutantes hormonais.....	56
2.3.2 Quantificação de tricomas não glandulares (NG) de alta densidade (tipo V).....	58
2.3.3 Quantificação de tricomas glandulares (G) de alta densidade (tipo VI).....	66
2.3.4 Conteúdo de aleloquímicos.....	69
2.3.5 Duplo mutante.....	71
2.3.5.1 Produção e seleção do duplo mutante.....	72
2.3.5.2 Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) no duplo mutante.....	73
2.3.5.3 Quantificação de tricomas NG de alta densidade (tipo V) no duplo mutante.....	75
2.3.5.4 Quantificação de tricomas G de alta densidade (tipo VI) no duplo mutante.....	77
2.3.5.5 Conteúdo de zingibereno no duplo mutante.....	79
2.3.6 qPCR.....	80
2.3.7 Testes de herbivoria.....	85
2.3.7.1 Testes com <i>Spodoptera frugiperda</i>	86
2.3.7.2 Testes com <i>Tuta absoluta</i>	89
2.4 Discussão.....	92
2.4.1 Densidade de tricomas é altamente influenciada por hormônios através de alteração na área celular.....	92
2.4.2 O ácido jasmônico e os brassinosteróides possuem papéis opostos na produção de tricomas, zingibereno e inibidores de protease.....	94
2.4.3 As várias alterações hormonais testadas não aumentam o conteúdo de Acil-açúcares.....	96
2.4.4 Resultados dos testes de herbivoria demonstram diferentes atuações dos mecanismos de defesa para o inseto polífono <i>S. frugiperda</i> e a praga de tomate <i>T. absoluta</i>	97

2.4.4 Interação hormonal entre brassinosteróides e ácido jasmônico.....	98
3 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	105

RESUMO

Controle hormonal da defesa à herbivoria em tomateiro

Apesar de sua elevada importância econômica mundial, o cultivo do tomateiro é classificado como de alto risco devido à infestação da cultura por um grande número de pragas e doenças. Esse problema leva tal cultura a depender amplamente da aplicação de agroquímicos que, além de elevarem o custo de produção, são potenciais causadores de danos ambientais e do aparecimento de outras pragas e doenças. Observando o problema mais detalhadamente, pode-se perceber que uma grande parcela das perdas advém dos danos causados por artrópodes herbívoros, os quais são capazes de se alimentar de diversas partes da planta, causando, geralmente, perda de produtividade. Apesar disso, o tomateiro apresenta mecanismos de defesa naturais contra tais pragas, como tricomas e aleloquímicos, que agem intoxicando os artrópodes, dificultando sua movimentação e/ou alterando várias fases de seu desenvolvimento. A busca por genótipos de tomateiro com maior densidade de tricomas e elevado teor de aleloquímicos é hoje considerado um *hot spot* de pesquisa, devido ao benefício que trariam como redução do custo de produção e maior produtividade. Sabe-se que vários hormônios vegetais estão ligados à geração de caracteres anti-herbivoria, mas, atualmente, um grande foco vem sendo dado somente ao ácido jasmônico, devido ao seu claro papel na formação de tricomas, aleloquímicos, inibidores de proteases, dentre outros. Visando mostrar a importância de uma abordagem “multi-hormonal” nesse tipo de estudo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar quais hormônios vegetais estão envolvidos com a formação de vários caracteres anti-herbivoria em tomateiro, como densidade de tricomas e teor de aleloquímicos e inibidores de protease. Para tal, fez-se uso de um grande número de mutantes hormonais introgrididos na cultivar Micro-Tom (a qual apresenta diversas facilidades de trabalho como porte reduzido e rápido ciclo de vida). Demonstrou-se que, apesar do ácido jasmônico ser extremamente importante na formação de tais caracteres, outros hormônios também atuam fortemente em tal papel. Etileno, giberelinas e auxina alteram de forma indireta a densidade de tricomas em tomateiro, através de alteração na área de células epidérmicas. O ácido jasmônico é um forte regulador positivo da formação de tricomas, do aleloquímico zingibereno e da formação de inibidores de protease. De forma antagonista, brassinosteróides parecem controlar negativamente a densidade de tricomas, a produção de zingibereno e inibidores de protease. Interessantemente, observou-se que esse controle negativo efetuado por brassinosteróides acontece através de um controle na via do ácido jasmônico, o qual foi comprovado pela produção de duplos mutantes. Resultados obtidos em testes com o herbívoro polífago *Spodoptera frugiperda* e com a praga de tomate *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro), bem como de análise de expressão gênica comprovaram a importância do ácido jasmônico, brassinosteróides e sua interação na defesa à herbivoria. Os resultados aqui apresentados sugerem que o foco para futuros estudos da formação de mecanismos anti-herbivoria em tomateiro deve ser voltado não só para o ácido jasmônico como para brassinosteróides e para suas ações antagonistas.

Palavras-chave: *Lycopersicon esculentum*; Micro-Tom; Hormônios; Ácido Jasmônico; Brassinosteróides

ABSTRACT

Hormonal control of herbivory defense in tomato

Even though the cultivation of tomato has a high economical importance, this culture is classified as being of elevated risk because of its common infestation by pests and diseases. This problem makes this culture greatly dependent of the application of several agrochemicals, which leads to increase in cost of production, environmental damages and also facilitating the appearance of new pests and diseases. Looking carefully to the problem, it is possible to conclude that a great part of tomato losses are caused by herbivory-arthropods, which are capable of feeding of several parts of the plant, causing, generally, losses in the productivity. However, tomato has natural defense mechanisms against those pests, for example trichomes and allelochemicals, which act poisoning the arthropods, hindering their movement through the plant and/or altering steps of their development. The search for tomato genotypes with great density of trichomes and elevated levels of allelochemicals is nowadays being considered as a *hot spot* of research, because of the benefits it would provide (for example: a decrease in the cost of production and also a higher productivity). Although it is believed that many plant hormones are involved in the generation of anti-herbivory traits, a great focus has been given only to jasmonic acid because of its clear action in the formation of those traits, such as trichomes, allelochemicals, proteinase inhibitors and many others. The present work objective was to evaluate which hormones are involved in the formation of anti-herbivory traits such as trichome density and allelochemicals and proteinase inhibitors content. For this reason, we made use of several hormonal mutants already introgressed in the Micro-Tom cultivar (which presents benefits as small size and fast life cycle). It was showed that jasmonic acid is an important hormone in the formation of these traits, but other phytohormones also play important roles. Ethylene, gibberellins and auxin alters trichome density indirectly, by altering the area of epidermal cells and thus cell number. Jasmonic acid is a positive regulator of trichome formation, the allelochemicals zingiberene content and also in the formation of proteinase inhibitors. However, brassinosteroids acts by negatively controlling all of those. Interestingly, we observed that this negative control happens through the control of jasmonic acid pathway, a hormonal interaction that was proved by double-mutant analysis. Results obtained in tests with the polyphagous insect *Spodoptera frugiperda* and the tomato specific pest *Tuta absoluta* (tomato pinworm) and also with *qPCR* showed the importance of jasmonic acid, brassinosteroid and their interaction in herbivory defense. Our data suggest that future studies about the formation of anti-herbivory traits should be analyzed by focusing the functions not only of jasmonic acid but also brassinosteroid and their antagonist functions.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*; Micro-Tom; Hormones; Jasmonic Acid; Brassinosteroids

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – **A)** Mutante *jai1-1* ao lado de um tomateiro Micro-Tom. O fenótipo das duas plantas é semelhante durante a fase vegetativa. **B)** Protusão do estilete no mutante *jai1-1*, demarcado com um círculo vermelho. **C)** Frutos de *jai1* não apresentam tricomas quando jovens. **D)** MT apresentando tricomas nos frutos. **E)** Comparação entre tamanho de frutos e sementes do mutante *jai1-1* e MT. (Barras = 0,5cm)..... 42
- Figura 2 – Esquema de obtenção de duplos mutantes (exemplificado para a obtenção do duplo mutante *dpy/dpy jai1-1/jai1-1*). Os números abaixo do genótipo da geração F2 representam a frequência esperada..... 49
- Figura 3 – Experimento com chance de escolha, onde dois quadrados de 4,64cm² de folhas de diferentes genótipos (MT x mutante analisado) são posicionados lado a lado. As lagartas são colocadas no pequeno quadrado branco entre as duas folhas, podendo escolher qual folha herbivorar. Após cinco dias, a área final dos quadrados é analisada..... 54
- Figura 4 – Densidade de tricomas tipo V (não-glandulares) por cm² na face adaxial (A) e abaxial (B) da cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 59
- Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura dos tipos de tricoma encontrados em *L. esculentum*: **A)** Tricoma G tipo I (barra=50µm); **B)** Tricoma NG tipo III (barra=50µm); **C)** Tricoma NG tipo V (barra=20µm); **D)** Tricomas G tipo VI e VII (barra=20µm). Duas hastes de tricoma tipo VI (sem cabeças glandulares) demonstrando seu formato triangular são mostradas em **A** próximo do tipo I. A densidade de tricomas na face adaxial dos mutantes hormonais é demonstrada em **E)** Micro-Tom; **F)** *epi*; **G)** *dgt*; **H)** *jai1-1* e **I)** *dpy*. Para E-I, barras=200 µm..... 60

- Figura 6 – Área celular (μm^2) na face adaxial (A) e abaxial (B) da cv. MT e mutantes hormonais mensurada através da técnica de *imprints* (WEYERS; JOHANSEN, 1985). Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 62
- Figura 7 – *Imprints* de células epidérmicas da face abaxial das folhas. **A)** MT; **B)** *epi*; **C)** *pro*; **D)** *gib3*; **E)** *dgt* e **F)** *dpy*. Para melhor visualização, as imagens tiveram suas cores invertidas (barras=100 μm)..... 63
- Figura 8 – Comparação na densidade de tricomas de *epi*. **A)** Folha nova e pilosa, **B)** Folha de meia idade e glabra. As duas fotos foram capturadas utilizando folhas da mesma planta (Barras = 100 μm)..... 64
- Figura 9 – Densidade de tricomas tipo VI (glandulares) por cm^2 na face adaxial (A) e abaxial (B) da cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 67
- Figura 10 – Conteúdo relativo de zgb por cm^2 em MT e nos mutantes hormonais. *L. hirsutum*, um produtor de elevados níveis de zgb é demonstrado como comparação. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparado com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 70
- Figura 11 – Quantificação de acil-açúcar por cm^2 em MT e nos mutantes hormonais. *L. pennellii*, um produtor de elevados níveis de zgb é demonstrado como comparação. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparado com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 71

- Figura 12 – Mutante *jai1-1* e *dumpy* (*dpy*) e gerações F1 e F2 de cruzamento entre eles. A geração F1 não apresenta fenótipo de nenhuma das duas mutações parentais, se assemelhando a MT (planta sem folhas enrugadas e fêmea fértil). A geração F2 aqui representada, porém, é um duplo mutante, contendo tanto a mutação *dpy* como *jai1-1*..... 73
- Figura 13 – Densidade de tricomas tipo V (não-glandulares) na face adaxial (A) e abaxial (B) do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente mostrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 76
- Figura 14 – Densidade de tricomas tipo VI (glandulares) na face adaxial (A) e abaxial (B) do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente mostrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 78
- Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a densidade de tricomas na face abaxial de A) Micro-Tom; B) *jai1-1*; C) *dpy* e D) *dpy* x *jai1-1* (Barras=200 μ m). É possível notar que a densidade de tricomas na face adaxial no duplo mutante se assemelha mais a *jai1-1* do que a *dpy*..... 79
- Figura 16 – Conteúdo relativo de zingibereno no duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente mostrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 80

- Figura 17 – Curvas de *melting* para o gene ZIS. A figura foi obtida utilizando o programa Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0. A letra “L” ao lado do nome do genótipo significa genótipo lesionado. Legenda: dj= *dpy* x *jai1-1*; Branco= reação sem presença de cDNA..... 82
- Figura 18 – Expressão relativa dos transcritos dos genes da via de biossíntese de JA (AOC e OPR3) na ausência (-) e presença de lesão (+). Os valores foram estimados através de comparação para o gene de referência (GAPDH) de MT não lesionado..... 83
- Figura 19 – Expressão relativa dos transcritos dos gene de resposta a JA (PI-I) e da SESQUITERPENE SYNTHASE (SSY) na ausência (-) e presença de lesão (+). Os valores foram estimados através de comparação para o gene de referência (GAPDH) de MT não lesionado..... 85
- Figura 20 – Teste de herbivoria com liberdade de escolha, utilizando o inseto polífago *Spodoptera frugiperda*. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). Barras de erro = erro padrão..... 87
- Figura 21 – Peso das larvas (mg) de *S. frugiperda* após 0 (peso inicial), 3, 6 e 9 dias de alimentação com as folhas. A soma das barras significa o peso final. Asteriscos significam diferenças estatísticas do peso final quando comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). Barras de erro = erro padrão..... 88
- Figura 22 – Comparativo entre folhas de MT em diferentes dias após contato com *Tuta absoluta*. Após um dia de contato (folha da esquerda) as minas ainda são pouco visíveis. Porém, após oito dias de contato (folha da direita), as lagartas já consumiram quase todo o parênquima da folha... 89
- Figura 23 – Mortalidade (%) de larvas de *Tuta absoluta* após N dias de alimentação com folhas de diferentes genótipos. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão..... 90

Figura 24 – Peso (mg) de larvas de <i>Tuta absoluta</i> após oito dias de alimentação com folhas de diferentes genótipos. Barras de erro = erro padrão.....	92
Figura 25 – Interação hormonal proposta para esse trabalho, envolvendo os hormônios ácido jasmônico e brassinosteróides na formação de tricomas e do aleloquímico zingibereno.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais classes hormonais e suas possíveis atuações na defesa contra lesões e herbivoria.....	35
Tabela 2 – Mutações hormonais introgridas na cv. Micro-Tom e utilizadas no presente trabalho.....	40
Tabela 3 – Tipos de tricomas em <i>Lycopersicon esculentum</i> segundo Luckwill (1943).....	45
Tabela 4 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de qPCR.....	52
Tabela 5 – Quantificação de tricomas glandulares (Tipos I e VII) e não-glandulares (Tipo III) de baixa densidade na superfície adaxial de MT e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das medias representam erro padrão.....	56
Tabela 6 – Quantificação de tricomas glandulares (Tipos I e VII) e não-glandulares (Tipo III) de baixa densidade na superfície abaxial de MT e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão.....	57
Tabela 7 – Frequência esperada e observada de aparecimento da mutação <i>jai1</i> e <i>dpy</i> no duplo mutante, seguido pelo teste de qui-quadrado ($gl=1$ $p=0,05$).....	73

- Tabela 8 – Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) na superfície adaxial do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente demonstrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão..... 74
- Tabela 9 – Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) na superfície abaxial do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente demonstrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AOC – *ALLENE OXIDE CICLASE*

ABA – Ácido abscísico

BR – Brassinosteróide

dgt – diageotropica

dpy – dumpy

epi – epinastic

GA – Giberelina

gib-3 – gibberellin deficient-3

JA – Ácido jasmônico

jai1-1 – jasmonic acid insensitive1-1

MeJA – Metil jasmonato

MT – Micro-Tom

not – notabilis

Nr – Never ripe

OPR3 – *OXOPHYTODIENOIC REDUCTASE3*

PI-I – *PROTEINASE INHIBITOR I*

PI-II – *PROTEINASE INHIBITOR II*

PI's – Inibidores de protease.

pro – procera

qPCR – quantitative Polimerase Chain Reaction

SA – Ácido salicílico

SSY – *SESQUITERPENE SYNTHASE*

Tricomas G – Tricomas glandulares

Tricomas NG – Tricomas não-glandulares

ZIS – α -*ZINGIBERENE SYNTHASE*

zgb – Zingibereno

1 INTRODUÇÃO:

Apesar de ser considerado como uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, o cultivo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L. [Solanaceae]) é tido como um investimento de elevado risco, devido ao fato dessa cultura ser amplamente atacada por diversas pragas e doenças, o que obriga o produtor a realizar a aplicação de defensivos, elevando o custo final do produto e, geralmente, acarretando em danos ao meio-ambiente.

Dentre os principais causadores de perdas na cultura do tomateiro estão os artrópodes herbívoros. A ação de herbivoria causadas por esses artrópodes é capaz, dentre outras, de reduzir a área fotossinteticamente ativa nas plantas, restringindo sua produtividade, além de causar lesões nos frutos, tornando-os inviáveis para comercialização. O ataque de alguns artrópodes herbívoros já foi responsável pela perda quase total da produção de tomate em alguns estados do Brasil na década de 80.

O tomateiro, por sua vez, apresenta algumas formas naturais de defesa que são comprovadamente ativas contra esse tipo de pragas. Revestindo quase toda a superfície da planta encontram-se os tricomas, protuberâncias epidérmicas capazes de dificultar a movimentação dos artrópodes, afetando assim vários estágios de seu desenvolvimento, desde a viabilidade das larvas até padrões de ovoposição. Os tricomas de tomateiro ainda são capazes de conter metabólitos secundários de comprovada ação defensiva que podem agir, dentre várias formas, intoxicando os artrópodes e até mesmo os levando a morte. A busca por genótipos de tomateiro contendo altas densidades de tricomas e elevados níveis de aleloquímicos é considerada um “*hot spot*” de pesquisa, uma vez que tais características elevariam a capacidade de defesa da planta contra tais pragas, minimizando o uso de defensivos, levando a um menor dano ao meio ambiente e menor custo de produção.

É de conhecimento que os hormônios vegetais desempenham importante papel na defesa a herbivoria. Vários trabalhos ligam os mais diversos hormônios a vários caracteres de defesa, como formação de tricomas, produção de proteínas de defesa, produção de metabólitos secundários, envolvimento na resposta ao ataque de patógenos, dentre outros fatores. Um hormônio em especial vem atraindo grande parte

da atenção devido ao fato de estar diretamente ligado a geração de caracteres de defesa a herbivoria e a lesões por patógenos necrotróficos. Trata-se do ácido jasmônico, uma oxilipina capaz de regular a produção de tricomas glandulares e de diversos aleloquímicos em tomateiro, bem como mediar várias das respostas ao ataque por tais tipos de pragas. O conhecimento da função dos outros hormônios vegetais em tal tipo de defesa, porém, ainda não se mostrou tão clara, principalmente devido à falta de trabalhos nesta área. O estudo da função destes hormônios e como eles interagem com o ácido jasmônico na formação da defesa a herbivoria poderia esclarecer diversas perguntas a respeito da defesa a herbivoria em tomateiro.

Uma das melhores formas de estudar hormônios vegetais, atualmente, se faz através da utilização de mutantes hormonais. Plantas mutantes com alterações endógenas para a produção/resposta aos diversos fitohormônios se mostram eficazes no estudo de tais compostos, uma vez que as alterações estão diretamente associadas com o hormônio envolvido na mutação. O uso de mutantes, porém, é dificultado pelas ausências de diferentes mutações hormonais em um mesmo *background* genético. A cultivar de tomateiro Micro-Tom, porém, oferece uma ampla biblioteca de mutantes já introgrididos em seu *background* genético, além de apresentar as mesmas qualidades do modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, como ciclo de vida rápido, pequeno porte e diversos marcadores moleculares já desenvolvidos. Cabe ainda dizer que o fato do tomateiro apresentar importância como alimento, o coloca à frente de *A. thaliana* em questão da importância de estudos ligados a defesa contra pragas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar como determinadas características de comprovada função anti-herbivoria se comportam em diversos mutantes hormonais de tomateiro já introgrididos na cultivar Micro-Tom. Para tal, os mutantes *diageotropica* (baixa sensibilidade a auxina), *Never ripe* e *epinastic* (baixa sensibilidade e superprodução do etileno, respectivamente), *notabilis* (defectivo na produção de ácido abscísico), *procera* e *gibberelin deficient3* (supersensibilidade e baixa produção de giberelina respectivamente), *dumpy* (defectivo na produção de brassinosteróides) e *jasmonic acid insensitive1-1* (insensível ao ácido jasmônico) tiveram quantificadas suas densidades de tricomas na face abaxial e adaxial das folhas, bem como o teor dos aleloquímicos zingibereno e acilaçúcares produzidos. Padrões

alterados de tais caracteres demonstrariam um efeito de um hormônio específico na produção daquele caractere.

Após o isolamento de mutantes candidatos, ou seja, aqueles com as características mais alteradas para mais ou para menos, criaram-se duplos mutantes entre tais mutantes candidatos e o mutante insensível ao ácido jasmônico *jasmonic acid insensitive1-1 (jai1-1)*. Uma vez que se sabe que *jai1-1* está envolvido na produção de tricomas e aleloquímicos, a produção de um duplo mutante entre este mutante e os mutantes candidatos permitiu observar possíveis interações hormonais responsáveis pela formação da defesa contra herbivoria. Tais interações também foram comprovadas através da quantificação da expressão de alguns genes da via de biossíntese/transdução de sinal do ácido jasmônico, por meio da técnica de *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR)

Concomitantemente, testes de herbivoria utilizando o inseto polífago *Spodoptera frugiperda* e a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* foram realizados a fim de se demonstrar, na prática, o papel dos hormônios na defesa contra tais tipos de insetos herbívoros.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Importância econômica e perdas na cultura do tomateiro: Infestação por artrópodes herbívoros.

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L. [Solanaceae]) é uma das hortaliças de maior interesse econômico para a agricultura mundial. Segundo dados da FAO (2008), a área plantada mundialmente no ano de 2007 foi de aproximadamente 4,62 milhões de hectares com uma produtividade mundial de cerca de 126,24 milhões de toneladas. A China é o maior produtor mundial da cultura, com cerca de 33,6 milhões de toneladas de tomate colhidas em 2007, seguida pelos EUA com 11,6 milhões. O Brasil figura como o oitavo maior produtor mundial com cerca de 3,36 milhões de toneladas colhidas no ano. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2002), o cultivo de tomate no país representa a sexta maior cultura em quantidade produzida (toneladas).

Apesar disso, o cultivo desta Solanaceae é classificado como uma cultura de alto risco devido ao elevado grau de infestação por diversas pragas e doenças. Assim, a produção de tomate requerer a aplicação de uma quantidade elevada de agrotóxicos, sendo que tais produtos químicos utilizados podem degradar o meio ambiente, favorecem o surgimento de pragas novas e/ou mais resistentes, além de encarecerem o custo de produção (LOOS et al., 2008; SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000). Em levantamento realizado por Davies, Hamilton e Lanini (1996) mostrou-se que, de toda a área norte-americana cultivada com tomate, 88% era tratadas com inseticidas e 64% com fungicidas. Estipula-se (ZALOM, 2003) que as perdas mundiais causadas somente pelas pragas em tomate representem aproximadamente 35% de toda sua produção. Sem a aplicação de defensivos as perdas seriam de aproximadamente 78%. Em países tropicais como o Brasil, o problema é ainda agravado quando observado que, nestas regiões, a temperatura e umidade elevadas favorecem o aparecimento e desenvolvimento das pragas (MALUF; CAMPOS; CARDOSO, 2001).

Observando o problema de forma mais detalhada, percebe-se que a infestação por artrópodes herbívoros é uma das maiores dificuldades enfrentadas no cultivo do tomateiro. Tais pragas causam danos diretos como perda de área fotossinteticamente ativa e conseqüente perda de produtividade, podendo também se alimentar de frutos, tornando-os indisponíveis para o consumo. Danos indiretos também podem ser citados, pois certos artrópodes herbívoros são vetores de vírus causadores das principais doenças dessa hortaliça.

Dentre os inúmeros artrópodes pragas mundiais de tomateiro, uma das maiores é *Bemisia argentifolii* Bellow & Perring (Hemiptera) (ou *Bemisia tabaci* genótipo B), conhecida popularmente como mosca-branca. As ninfas desse inseto já foram capazes de causar perdas em tomateiros na casa de bilhões de dólares somente no estado da Flórida, Estados Unidos (DE QUATTRO; SENFT; WOOD, 1997). *B. argetifolli* ainda é capaz de transmitir viroses ao tomateiro (MUIGAI et al., 2002) e apresenta alta resistência aos inseticidas atualmente utilizados (SILVA, 2006). *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera), conhecida como traça-do-tomateiro, é outra das principais pragas da cultura, sendo uma das causadoras da diminuição drástica da área cultivada (HAJI, 1992; LABORY et al., 1999). As larvas dessa traça atacam o tomateiro em qualquer estágio de desenvolvimento, provocando lesões em folhas e frutos sendo outrora responsáveis pela perda de mais de 50% da produção de tomate da região Nordeste do Brasil, ao final da década de 80 (SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000). *T. absoluta* ainda apresenta resistência a maioria dos inseticidas utilizados (SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000), sendo considerada de difícil controle. Outra grande praga de tomateiro é o ácaro *Tetranychus urticae* Koch. (Acari) popularmente conhecido como ácaro-rajado. Esse artrópode é responsável pelo desfolhamento da planta, causando inibição da fotossíntese e conseqüente diminuição do número e tamanho de frutos (ARAGÃO et al., 2000; FLETCHMAN, 1990).

2.1.2 Mecanismos naturais de defesa a herbivoria

Apesar de ser amplamente atacado por diversas pragas, o tomate possui uma série de mecanismos naturais de defesa capazes de conferir resistência ao ataque por tais. Uma forma de resistência natural da planta é a presença de tricomas em caules,

folhas, flores, sépalas e frutos. A presença de tricomas é tida como um dos fatores morfológicos que mais influenciam a resistência a herbivoria, sendo considerada como o principal fator de resistência de *L. esculentum* a artrópodes (LARA, 1991). Os tricomas podem alterar o padrão de ovoposição, reprodução, digestibilidade e locomoção de artrópodes dentre vários outros fatores (CHATZIVASILEIADIS; SABELIS, 1997; LARA, 1991; WAGNER, 2001). Além disso, grande parte da defesa proporcionada pelos tricomas provém de metabólitos secundários acumulados em tricomas glandulares e o tomateiro é conhecido como uma espécie com alto nível de acumulação de tais metabólitos (~5 a 30% do peso seco das folhas, segundo Wagner (2001)). Em seus tricomas glandulares, o tomateiro produz metabólitos secundários capazes de gerar efeito metabólico tóxico (antibiose) ou deterrente (não preferência), agindo mecânica ou quimicamente em artrópodes, de forma a conferir resistência.

Um dos vários exemplos de aleloquímicos presentes em tomateiro são os ésteres de glicose/sacarose e ácidos graxos conhecidos como acil-açúcares (RESENDE et al., 2006). Tais compostos atuam como armadilhas para artrópodes devido ao fato de apresentarem um aspecto pegajoso, o que reduz a mobilidade desses patógenos sobre a planta (RESENDE et al., 2002a). Assim, há diminuição no número de lesões e de folhas atacadas por *Tuta absoluta* e *Tetranychus* (RESENDE et al., 2002a, 2002b) e possível redução de ovoposição de *Bemisia sp.* (SILVA, 2006). A espécie selvagem *Lycopersicon pennellii* (Correll) D'Arcy (syn. *Solanum pennellii* Correll) é conhecida por apresentar altos níveis de tal metabólito em seus tricomas e, conseqüentemente, elevada resistência a uma ampla gama de artrópodes herbívoros (BLAUTH; CHURCHILL; MUTSCHLER, 1998; NOMBELA; BEITIA; MUÑIZ, 2000; SAEIDI; MALLIK; KULKARNI, 2007).

Outro metabólito secundário encontrado em tomateiro, ligado a defesa contra herbivoria, é o sesquiterpeno zingibereno. Esse composto é um dos maiores constituintes do óleo essencial das raízes de gengibre (CHEN; HO, 1988), o que confere o seu nome. Ele é responsável, por exemplo, pela diminuição de mobilidade nas folhas por ácaros *Tetranychus* (MALUF; CAMPOS; CARDOSO, 2001). A espécie selvagem *Lycopersicon hirsutum* Dunal (syn. *Solanum habrochaites* S. Knapp & D.M. Spooner) apresenta um alto conteúdo de tal metabólito em seus tricomas (CARTER;

GIANFAGNA; SACALIS, 1989), e conseqüente resistência a pragas como *Leptinotarsa decemlineata* (CARTER; SACALIS; GIANFAGNA, 1989), *Spodoptera exigua* (EIGENBRODE et al., 1994), *Tuta absoluta* (AZEVEDO et al., 2003), entre outras.

A busca por genótipos de tomateiro com maiores produções de tricomas e dos compostos supracitados pode ser considerado um “hot-spot” de pesquisa no gênero *Lycopersicon* (SIMMONS; GURR, 2005). É fácil perceber que tais genótipos provavelmente conferirão uma maior resistência aos artrópodes gerando menor utilização de pesticidas, o que por fim reduz a degradação ambiental e o custo de produção. Como exemplo, pode-se citar as espécies selvagens supracitadas que apresentam elevadas quantidades de metabólitos secundários e que vêm sendo constantemente retrocruzadas com *L. esculentum*, em busca da transferência de tais caracteres à espécie cultivada (ARAGÃO et al., 2000; GILARDÓN et al., 2001, MALUF; CAMPOS; CARDOSO, 2001, RESENDE et al., 2002a, 2006).

2.1.3 A atuação dos hormônios na defesa: O papel do ácido jasmônico

A atuação dos diversos hormônios vegetais na composição da defesa e respostas a lesões e herbivoria em plantas é evidente. Atualmente, alguns estudos vêm demonstrando tal papel. Trabalhando com *Solanum phujera*, Pena-Cortéz, Willmitzer e Sánchez-Serrano (1991) observaram que o ácido abscísico (ABA) está envolvido em parte da regulação gênica de inibidores de proteases (PI's), proteínas que reduzem a digestibilidade das partes vegetais no trato digestivo dos herbívoros. As citocininas também parecem ativar genes que levam à expressão de PI's (KERNAN; TORNBURG, 1989). A ação das giberelinas (GA) na indução de tricomas já foi comprovada em *Arabidopsis* (CHIEN; SUSSEX, 1996; PERAZZA; VACHON; HERZOG, 1998), embora essa espécie não seja um bom modelo para o estudo do envolvimento de tricomas na resistência a artrópodes, já que só possui tricomas unicelulares (não-glandulares). A aplicação exógena de auxina está envolvida na regulação de produção de metabólitos secundários (ARROO et al., 1995). A Tabela 1 descreve algumas classes hormonais e suas atuações na defesa vegetal contra lesões e herbivoria.

Tabela 1 – Principais classes hormonais e suas possíveis atuações na defesa contra lesões e herbivoria

Classe Hormonal	Função	Referência
Auxina	Regulação de metabólitos secundários, Regulação de expressão gênica de inibidores de proteinases.	Arroo et al. (1995); Kernan, e Tornburg (1989).
ABA	Regulação de expressão gênica de inibidores de proteinases e polifenol oxidase.	Cutting e Bower (1987), Pena-Cortés, Willimitzer, Sánchez-Serrano (1991).
Etileno	Regulação de expressão gênica de inibidores de proteinases, Mediador de resposta a lesões.	Kernan e Tornburg (1989), O'Donnell <i>et al.</i> (1996)
Citocininas	Regulação gênica de inibidores de proteinases.	Kernan e Tornburg (1989)
GA's	Produção de tricomas.	Chien e Sussex, (1996), Perazza (1998)
Brassino-esteróides	Indícios de envolvimento na formação de tricomas	Perraza, Vachon e Herzog (1998)
Ácido Jasmônico	Desenvolvimento de tricomas, produção de metabólitos secundários, mediador de resposta a lesões, resposta a fatores bióticos e abióticos, produção de inibidores de proteases e polifenol oxidase.	Li et al. (2004), Chen, Jones e Howe (2006), Moons et al. (1997), Creelman e Mullet (1997), Thaler et al. (1996).

Observa-se na Tabela 1 que o ácido jasmônico é uma classe hormonal amplamente envolvida com processos de sinalização e defesa contra lesões mecânicas ou por herbivoria (SEO; SANO; OHASHI, 1997). Tal hormônio vem recebendo grande parte do atual enfoque de trabalhos nesta área.

Comumente referido como JA, o ácido jasmônico é um hormônio pertencente a um grupo de ácidos graxos bioativos denominados oxilipinas, os quais estão envolvidos em diversos processos do desenvolvimento e estão presentes em quase todo o reino vegetal (CHEN; JONES; HOWE, 2006, HOWE et al., 1996, Li et al., 2002, 2004). Vários

desses processos já são conhecidos, como inibição/promoção de germinação e retardo do crescimento (CREELMAN; MULLET, 1997), regulação de expressão gênica (PENA-CORTÉS et al., 1993), promoção de senescência (HE et al., 2002), resposta a estresses salinos (MOONS et al., 1997), resposta a radiação UV (MACKERNESS et al., 1999), bem como a atuação no desenvolvimento de órgãos sexuais (FEYS et al., 1994; LI et al., 2004). Um dos mecanismos mais interessantes controlados pelo JA é exatamente o que diz respeito ao recrutamento de mecanismo de resposta a fatores bióticos e abióticos (CREELMAN; MULLET, 1997). Isso se dá devido ao efeito integrado do JA na resposta a lesões (ELLARD-IVEY; DOUGLAS, 1996), produção de tricomas (LI et al., 2004) e metabólitos secundários (CHEN et al., 2006).

Dentro do gênero *Lycopersicon*, processos regulados por JA também são conhecidos, como o controle maternal do desenvolvimento de sementes, bem como das anteras (LI et al., 2004), a resposta de defesas a patógenos (LI et al., 2002), a produção de proteínas de resposta a lesões como inibidores de proteases (PI) e polifenol-oxidase (PPO) (THALER et al., 1996), o desenvolvimento de tricomas glandulares (LI et al., 2004) e a produção de metabólitos secundários (CHEN et al., 2006). Esses últimos denotam que JA está envolvido em alguns dos mecanismos que desencadeiam respostas de defesa a herbivoria em genótipos de tomateiro.

A importância de JA na atuação dentro desses mecanismos de defesa vem sendo amplamente pesquisada e pode representar uma diferenciada abordagem na busca por plantas mais resistentes aos ataques de artrópodes. Porém, o que se observa é que há uma quase completa negligência em relação aos outros hormônios (ROBERT-SEILANIAN et al., 2007) e as interações entre JA e as outras classes hormonais nesse tipo de estudo. Como já demonstrado, o papel de diversos hormônios na defesa a herbivoria é evidente (Tabela 1) e não pode ser descartado. Da mesma forma, as interações geram padrões que não são bem compreendidos ou não são percebidos quando analisados sob a ótica de um hormônio apenas.

A interação entre JA e outras classes hormonais já foi demonstrada anteriormente em alguns poucos casos da literatura. Desse modo, foi demonstrado por Zhu et al. (2006) que a aplicação de JA estimula a produção de pêlos radiculares em *Arabidopsis*, sendo que o mesmo não ocorre quando inibidores de etileno são

fornecidos juntamente com JA ou quando mutantes com pouca sensibilidade a etileno são usados. A interação entre o etileno e JA também já foi comprovada na regulação de PI's em resposta a herbivoria (O'DONNELL et al., 1996). De modo semelhante, Lee, Partier e Löbner (1996) comprovaram que várias proteínas envolvidas em rotas de sinalização de defesa, expressas sob presença de ABA, também são expressas em resposta a JA. Por outro lado, Birkenmeier e Ryan (1998) demonstraram que o ácido abscísico não atua como um sinal primário para respostas a lesões, mas é essencial para a manutenção das condições fisiológicas da planta durante a geração de respostas a esse tipo de estresse.

Além do pouco conhecimento sobre a interação de JA com outras classes hormonais, o entendimento sobre o papel fisiológico dessa substância também é limitado pelo fato de muitas das inferências terem sido retiradas de experimentos envolvendo a aplicação de JA exógeno. Essa prática pode ser considerada desaconselhável devido ao fato dos tratamentos exógenos geralmente refletirem efeitos farmacológicos e não fisiológicos, além do JA exógeno não apresentar alvo celular específico (CHEN et al., 2006, LI et al., 2002). Assim, há apelo para a utilização de uma abordagem genética envolvendo mutantes, os quais são mais adequados para comprovar a função do hormônio *in vivo*, sem que haja comprometimento de outros processos celulares.

2.1.3.1 Mutantes em ácido jasmônico

Mutantes em JA são disponíveis em pelo menos dois modelos genéticos: tomateiro e *Arabidopsis*. Exemplos de mutantes em JA em tomateiro são: *defenseless1* (*def1*), *suppressed in prosystemin-mediated responses1* e *2* (*spr1* e *spr2*) e *jasmonic acid insensitive 1-1* (*jai1-1*). O mutante *spr2*, por exemplo, é incapaz de produzir respostas locais e sistêmicas a lesões devido ao fato de apresentar uma disfunção na rota dos octadecanóides (a qual leva a biossíntese de JA). Esse mutante produz quantidades reduzidas de PI's, as quais são responsáveis por parte da defesa da planta a ataques de herbivoria (LI et al. 2002). O mutante *def1* (HOWE et al., 1996) confere uma alteração semelhante a *spr2* nesta mesma via metabólica. Esse mutante bloqueia a cadeia em algum ponto entre os dois intermediários da via dos octadecanóides: ácido

13(S)-hidroperoxilinolênico (HPLA) e ácido 12-oxofitodienóico (OPDA), impedindo, conseqüentemente, a formação de JA. De modo diferente dos mutantes deficientes em JA, o mutante *jai1-1* produz JA, porém não é responsivo a esse. Esse fenótipo é gerado por uma deleção em dois dos três éxons responsáveis pela expressão de uma proteína envolvida na sinalização de JA. O mutante *jai1-1* apresenta desenvolvimento falho de sementes e frutos, além de possuir uma redução na quantidade de tricomas na superfície de frutos e folhas, de aleloquímicos e de PI's. A deficiência de caracteres anti-herbivoria neste mutante é tão exacerbada que o contato com insetos herbívoros pode facilmente levar a morte da planta (LI et al., 2004).

2.1.4 A cultivar Micro-Tom

As pesquisas com abordagem genética (mutantes) em *Lycopersicon* apresentam limitações, uma vez que ao tamanho das plantas e de seus ciclos de vida relativamente longos não permitem estudos em curto prazo, gerando uma desvantagem em relação ao modelo vegetal *Arabidopsis*. A cultivar miniatura Micro-Tom (MT), criada para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989), foi proposta por Meissner et al. (1997) como modelo para estudos genéticos em *Lycopersicon esculentum*, pois é capaz de crescer em altas densidades (mais de 1000 indivíduos.m⁻²), além de ter um ciclo de vida curto, de aproximadamente 90 dias com frutos maduros em 75 dias, e contar com vários marcadores genéticos identificados (LIMA et al., 2004, MEISSNER et al., 1997). Essa cultivar vem ganhando espaço em estudos genéticos e fisiológicos (DAN et al., 2006; ISAACSON et al., 2002; LI et al., 2004; OBIADALLA-ALI et al., 2004), tendo, inclusive, bancos de EST desenvolvidos exclusivamente para ela no Kazuza Institute no Japão (YANO et al., 2006). Em relação aos mutantes em JA acima citados, *jai1-1* já se encontra no background genético dessa cultivar (LI et al., 2004), bem como outros mutantes para diversos hormônios, os quais foram introgrididos neste background em nosso laboratório (CARVALHO, 2008; LIMA et al., 2004; PINO-NUNES, 2005).

Fazendo o uso dos benefícios desta cultivar, o presente trabalho visou investigar quais hormônios estão envolvidos na geração de alguns padrões de defesa contra herbivoria em tomateiro. Para tal se buscou entre diversos mutantes hormonais disponíveis no background MT aqueles que demonstravam alterados padrões para

densidade de tricomas e quantidade de aleloquímicos associados à defesa (zingiberenos e acil-açúcares). Isolando mutantes candidatos, duplos mutantes com o mutante *jai1-1* foram produzidos visando encontrar possíveis interações hormonais relacionadas com respostas a herbivoria. Por fim realizou-se o teste de resistência a pragas para entender o real papel de tais hormônios na defesa a herbivoria.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Material vegetal

Todo o material vegetal utilizado nos experimentos foi cultivado na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP. A casa de vegetação deste laboratório apresenta condições de temperatura controlada e irrigação automatizada, sendo projetada para cultivo simultâneo de um grande número de genótipos de tomateiro, com ênfase no modelo Micro-Tom. As plantas no porte MT e espécies selvagens (porte alto) foram cultivadas em vasos com capacidade para 100 g e 10 kg de substrato respectivamente; substrato o qual foi constituído de uma proporção de 1:1 de Plantmax HT (Eucatex) + vermiculita expandida. Para cada 1 L desta mistura foi adicionado 4 g de calcário e 1 g de NPK 10-10-10. Especificações da casa de vegetação e protocolos de cultivo podem ser obtidos no site <http://www.esalq.usp.br/tomato> (Protocolos > Manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 1: Especificações da casa de vegetação e Protocolos > Manual do modelo vegetal Micro-Tom – Cap. 2: Plantio, irrigação e adubação).

Todos os mutantes hormonais utilizados neste trabalho já se encontram introgridos na cv. Micro-Tom (CARVALHO, 2008) e estão descritos detalhadamente na tabela 2. Para todos os experimentos realizados, as plantas apresentavam idade de 40 a 60 dias (fase de florescimento/início de frutificação), utilizando sempre a cultivar MT como controle.

Tabela 2 – Mutações hormonais introgrididas na cv. Micro-Tom e utilizadas no presente trabalho

Mutantes	Crom.*	Classe	Função gênica	Característica morfológica	Ref.
<i>diageotropica (dgt)</i>	1 (152)	Auxina	Baixa sensibilidade. Defectivo para uma proteína ciclofilina.	Raízes sem ramificação e folhas hiponásticas.	Oh et al. (2006)
<i>Never ripe (Nr)</i>	9	Etileno	Baixa sensibilidade. Defectivo para um receptor de etileno.	Amadurecimento retardado do fruto.	Wikinson et al. (1995)
<i>epinastic (epi)</i>	4	Etileno	Alta produção de etileno. Função gênica desconhecida.	Epinastia severa, caules e pecíolos dilatados.	Fujino et al. (1988)
<i>notabilis (not)</i>	7 (40)	ABA	Baixos níveis de ABA. Defectivo na clivagem de carotenóides (NCED).	Extremo murchamento das folhas sob estresse.	Burbidge et al. (1999)
<i>gibberellin deficient3 (gib3)</i>	7 (64)	GA	Baixos níveis de GA. Defectivo para ciclase que produz o ent-Kaureno.	Crescimento reduzido, folhas verde-escuras e pequenas.	Koornneef et al. (1990)
<i>procera (pro)</i>	11	GA	Supersensível a GA. Mutação perda de função no domínio de repressão das proteínas DELLA	Folhas com borda contínua, caule alongado.	Bassel, Mullen e Bewley (2008)
<i>dumpy (dpy)</i>	2 (57)	BR	Baixos níveis de BR. Provável defectivo para a conversão de 6-deoxocatasterona em 6-deoxoteasterona	Folhas rugosas e verde-escuro, entrenós curtos.	Koka et al., 2000
<i>jasmonic acid insensitive1-1 (jai1-1)</i>	5	JA	Insensível a JA. Perda de função em uma proteína F-box requerida no processo de sinalização de JA.	Leve protusão do estilete. Ausência de tricomas nos frutos.	Li et al., 2004

*Os números indicados correspondem ao cromossomo e a posição da mutação (entre parênteses) dentro de cada um dos 12 cromossomos de tomateiro. ABA = ácido abscísico; GA = giberelina; JA = ácido jasmônico, BR= brassinoesteróide. Nomes de genótipos iniciando em letras maiúsculas ou minúsculas denotam alelos dominantes ou recessivos, respectivamente.

2.2.2 Tratamento com hormônios exógenos (Somente para *gib3* e *jai1-1*).

Duas mutações exigiram a aplicação de hormônios exógenos a fim de viabilizar seu uso no trabalho: o mutante em GA *gib3* e o mutante em JA *jai1-1*.

Sabe-se que as GA's desempenham um papel fundamental na germinação de sementes (GROOT; KARSSSEN, 1987; KOORNNEEF; BENTSINK; HILHORST, 2002). A maioria dos mutantes defectivos na biossíntese de GA, a exemplo do mutante *gib3*, não possuem a capacidade de germinar a menos que seja aplicada alguma fonte externa desse hormônio as suas sementes. Para que a germinação deste genótipo ocorresse, as sementes de *gib3* foram germinadas em caixa gerbox escura contendo papel filtro embebido com 10 mL de GA₃ 100 µM (KOORNNEEF et al., 1990). Cinco dias após a germinação, as plântulas de *gib3* foram então aclimatadas em casa de vegetação sobre o mesmo substrato para os demais genótipos (descrito no item 2.2.1).

jai1-1 é um mutante insensível ao ácido jasmônico. Apesar de este hormônio estar envolvido em vários processos durante o desenvolvimento vegetal (CREELMAN; MULLET, 1997; FEYS et al., 1994; MACKERNESS et al., 1999; PENA-CORTÉS et al., 1993), o fenótipo deste mutante pouco difere de MT durante seu estágio vegetativo (Figura 1A), salvo apenas o número de tricomas glandulares nas folhas, que é menor em *jai1-1* (LI et al., 2004). Características morfológicas mais facilmente observadas ocorrem durante o estágio reprodutivo da planta, como a leve protusão do estilete (Figura 1B), total ausência de tricomas nos frutos jovens (Figura 1C e 1D) além de tamanho diminuto do fruto quando comparado a MT. Essa diminuição do fruto de *jai1-1* é causada por sua esterilidade feminina, a qual acaba por gerar sementes pequenas e inviáveis dentro fruto (Figura 1E). Devido a esta esterilidade feminina, faz-se necessário cruzar tal planta com MT para a manutenção de sementes (onde *jai1-1* doa pólen para MT), o que faz com que a mutação segregue, exigindo uma constante triagem do mutante em meio a plantas não mutantes.

Figura 1 – **A)** Mutante *jai1-1* ao lado de um tomateiro Micro-Tom. O fenótipo das duas plantas é semelhante durante a fase vegetativa. **B)** Protusão do estilete no mutante *jai1-1*, demarcado com um círculo vermelho. **C)** Frutos de *jai1* não apresentam tricomas quando jovens. **D)** MT apresentando tricomas nos frutos. **E)** Comparação entre tamanho de frutos e sementes do mutante *jai1-1* e MT. (Barras = 0,5cm)

O que se observa, porém, é que salvo o número de tricomas glandulares nas folhas (característica de não tão fácil observação), todas as outras características morfológicas que permitiriam a triagem deste mutante em meio a plantas não mutantes são observadas somente na fase reprodutiva, ou seja, entre 50 e 70 dias de idade. Dessa forma, a idade na qual é possível triar as plantas *jai1-1* homozigotas é um pouco acima daquela das plantas que foram utilizadas no trabalho. Assim, fez-se necessário utilizar um mecanismo de triagem em estagio juvenil, o qual foi realizada segundo metodologia proposta por Li et al. (2004) (salvo alterações), utilizando metil-jasmonato (MeJA). É conhecido que plântulas de tomateiro crescendo em meio contendo jasmonato exógeno (ex. metil-jasmonato) apresentam inibição de alongamento radicular, redução de crescimento do hipocótilo e acúmulo de antocianina no hipocótilo (LI et al., 2004). Espera-se que plantas insensíveis a esse hormônio sejam capazes de crescer normalmente em um meio contendo jasmonato exógeno. O crescimento de plântulas em MeJA é, portanto, um ótimo mecanismo para triagem dos mutantes insensíveis ao JA. Dessa forma, o teste de sensibilidade ao MeJA foi utilizado como forma de triar o mutante *jai1-1* em fase de plântula. Para tal, sementes de *jai1-1* segregantes foram germinadas em caixas gerbox contendo um papel filtro embebido com água destilada, na ausência de luz, a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Após três dias, quando as sementes já se encontravam germinadas e com radícula com aproximadamente 0,2 cm de comprimento, essas foram transferidas para uma caixa gerbox escura contendo um papel filtro embebido com 10 mL de MeJA 0,5mM (Sigma-Aldrich), solvido em 75 μL de etanol, permanecendo ainda em meio escuro a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais dois dias. Após esse período, as caixas gerbox foram transferidas para um ambiente na presença de luz ($55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por mais dois dias. Ao final desse período, as plantas que apresentavam resposta ao MeJA (inibição de crescimento radicular e do hipocótilo e acúmulo de antocianina no hipocótilo), foram separadas daquelas que cresciam normalmente devido a insensibilidade ao jasmonato. As plântulas selecionadas foram aclimatadas em casa de vegetação sobre o mesmo substrato para os demais genótipos (descrito no item 2.2.1).

2.2.3 Busca de mutantes candidatos

Visando elucidar quais hormônios poderiam estar participando do estabelecimento de características envolvidas na defesa a herbivoria, os mutantes descritos na tabela 2 foram submetidos à quantificação de tricomas, bem como a mensuração do teor de alguns de seus aleloquímicos.

2.2.3.1 Quantificação de tricomas

A presença de tricomas é tida como uma das primeiras barreiras anti-herbivoria em tomateiro (LARA, 1991), sendo um dos parâmetros mais avaliados em trabalhos de resistência (GOFFREDA; MUTSCHLER; TINGEY, 1988; KAUFFMAN; KENNEDY, 1989; LI et al., 2004; SAEIDI; MALLIK; KULKARNI, 2007; SELVANARAYANAN; NARAYANASAMY, 2006). Tal quantificação é geralmente realizada com fixação das folhas em etanol 70% por 72 h para então realização de cortes paradérmicos na superfície adaxial e abaxial das folhas. Porém, tal metodologia se mostrou muito destrutiva já que a realização do corte paradérmico e aplicação da lamínula sobre a lâmina ocasionam destruição de tricomas glandulares impedindo sua identificação e classificação. Sendo assim, a contagem de tricomas nos genótipos avaliados foi realizada em microscópio estereoscópico, o qual se mostrou mais eficaz e menos laborioso para tal propósito.

Uma vez que a densidade de tricomas nas folhas de tomateiro é altamente dependente da idade da folha (LI et al., 2004), utilizaram-se folhas de mesma fase para todas as observações, retiradas do terço médio das plantas e colocadas sobre uma placa de petri demarcada com uma área de 0,25 cm², na qual foram realizadas a contagem e identificação dos tricomas. A contagem foi feita na face abaxial e adaxial das folhas, retirando-se duas folhas por planta. Foram utilizadas 20 plantas por genótipo.

A classificação dos tricomas foi baseada na proposta por Luckwill (1943) para tricomas do gênero *Lycopersicon*, de acordo com a morfologia e presença/ausência de glândulas. Segundo tal, sete são os tipos de tricomas presentes no gênero, porém, somente cinco deles estão presentes em *Lycopersicon esculentum* como descrito na tabela 3 (SIMMONS; GURR; 2005).

Tabela 3 – Tipos de tricomas em *Lycopersicon esculentum* segundo Luckwill (1943)

Tipo de Tricoma	Descrição
I – Glandular	Longos (1,5 a 2,5mm) com base multicelular, haste pluricelular e pequena cabeça unicelular.
III – Não glandular	Longos (0,4 a 1,0mm), com base unicelular, haste pluricelular e sem cabeça glandular.
V – Não glandular	Pequenos (0,1 a 0,3mm), sem base, com haste pluricelular e sem cabeça glandular.
VI – Glandular	Pequenos (0,1 a 0,5mm), sem base, com haste unicelular cônica e cabeça glandular tetracelada.
VII – Glandular	Pequenos (0,01 a 0,1mm), sem base, com haste cilíndrica unicelular e cabeça tetracelada.

Genótipos com densidade de tricomas mais discrepantes em relação ao controle também foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Para tal, folhas dos genótipos foram fixadas em uma solução de Karnowsky modificada (KARNOWSKY, 1965), composta por 2,0% (v/v) de glutaraldeído em 0,05 M de tampão cacodilato de sódio pH 7,2. Após fixação, as amostras foram lavadas três vezes em água destilada e desidratadas em gradiente de etanol (30, 50, 70, 80%), seguida por três lavagens em etanol 100%. As amostras foram então secas em ponto crítico utilizando CO₂ líquido. Amostras secas foram posicionadas sobre “stubs” metálicos recobertas com uma camada de 20nm de ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 (VP) (Carl Zeiss - Alemanha) a 20kV.

2.2.3.2 Número de células epidérmicas

Para a quantificação da área das células epidérmicas utilizou-se a técnica de *imprints* (POOLE et al., 1996; WEYERS; JOHANSEN, 1985). Para tal, moldes (*imprints*) das superfícies das folhas foram obtidos usando as resinas Speedex Light Body e Speedex Universal Activator (Vigodent; Rio de Janeiro), as quais, quando misturadas, formam um polímero que é capaz de retirar uma impressão da superfície as quais estavam contato. Após polimerização, os moldes foram retirados das folhas sendo adicionada uma fina camada de esmalte transparente de unha (L'Oréal; São Paulo) a

esse. Essa camada de esmalte de unha foi analisada sob microscópio de luz, representando com confiança a superfície epidérmica das plantas (WEYERS; JOHANSEN, 1985). Para a quantificação da área celular se fez uso do programa ImageJ (disponível em: <http://rsbweb.nih.gov/ij>). As imagens obtidas tiveram suas cores invertidas para facilitar a visualização.

Para o teste foram utilizadas 15 folhas retiradas do terço médio de cada genótipo, sendo obtido um *imprint* da face adaxial e um da face abaxial de cada uma das folhas analisadas. As análises de número de células bem como a quantificação de tricomas foram realizadas no laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas do prof. Dr. Marcilio de Almeida.

2.2.3.3 Quantificação de zingibereno

Para a quantificação do sesquiterpeno zingibereno (zgb) se utilizou o método descrito por Freitas (1999). Para tal, seis discos foliares de 1 cm² foram retirados do terço médio de plantas com 35 dias de idade e colocadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de hexano. Os tubos foram agitados em vórtex por cerca de 30 s. As folhas foram então retiradas e fez-se a leitura de absorbância dos tubos em espectrofotômetro a 270 nm, sendo essa absorbância diretamente proporcional a quantidade de zgb nos tubos. Esse método é altamente correlacionado a padrões de zgb obtidos por HPLC.

Sabe-se que a espécie selvagem *Lycopersicon hirsutum* possui elevados níveis de zgb em seus tricomas glandulares (FREITAS et al., 2002; GONÇALVES et al., 2006). Como forma de validar o método utilizado, quantificou-se também este metabólito secundário em *L. hirsutum* (PI 127826).

Para a quantificação de zgb foram utilizadas 20 folhas de cada genótipo, retiradas do terço médio das plantas, incluindo a espécie selvagem. As análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-Colheita do prof. Dr. Ricardo Kluge.

2.2.3.4 Quantificação de acil-açúcares

A quantificação de acil-açúcares se deu segundo método proposto por Resende et al. (2002a), salvo modificações. Doze discos de 1 cm² retirados de folhas do terço médio dos genótipos analisados foram colocados em tubos de ensaio contendo 2 mL de diclorometano. Após agitação por 30 segundos no vórtex, as folhas foram retiradas e o solvente foi evaporado. Adicionou-se então 1 mL de NaOH 0,1 M solvido em metanol, o qual foi evaporado em seguida. Esse processo promove a saponificação dos grupos acilados dos acil-açúcares, liberando o açúcar presente. O solvente foi então evaporado e o resíduo mantido sob alta temperatura (~100°C), adicionando-se 1 mL de metanol por três vezes a cada dois minutos, para garantir a reação. Após total evaporação do metanol, o resíduo foi dissolvido em 0,8 mL de água. Adicionou-se 0,2 mL de HCl 0,04M, aquecendo até a ebulição, com objetivo de inverter os açúcares não redutores para açúcares redutores. Após resfriamento, a quantificação de açúcares redutores foi feita utilizando o reagente de DNS (MILLER, 1959; SCHWAN; ROSE, 1994). Para preparo do reagente, dissolveu-se 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS) em 500 mL de água destilada a 85°C. Essa solução foi estocada até completo resfriamento, adicionando então 200 mL de NaOH 2 M, 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio (também conhecido como sal de Rochelle), completando o volume para 1 L com água destilada. O reagente foi armazenado em um frasco escuro e a temperatura ambiente. Para o teste, 800 µL da solução de DNS foram misturadas a 800 µL da solução contendo os açúcares redutores. Essa mistura foi então colocada em água fervente durante cinco minutos. Após resfriamento, foi feita a leitura em espectrofotômetro ajustado a 540nm. Para obtenção de curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de glicose (0; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 mM) (MILLER, 1959).

Foram mensurados também os níveis de acil-açúcares na espécie selvagem *Lycopersicon pennellii* (LA716) o qual é conhecido por possuir elevados níveis de tais compostos (GONÇALVES et al., 2007; RESENDE et al., 2002b), como forma de avaliar método utilizado. Para este teste 15 folhas retiradas do terço médio de cada um dos genótipos foram utilizadas.

2.2.4 Duplos mutantes

Após serem isolados mutantes candidatos, ou seja, aqueles que apresentavam alterações para os caracteres de defesa a herbivoria analisados (número de tricomas e níveis de aleloquímicos), duplos mutantes entre eles e o mutante insensível ao ácido jasmônico *jai1-1* foram produzidos objetivando averiguar possíveis interações hormonais.

2.2.4.1 Produção dos duplos mutantes

Para a produção dos duplos mutantes, utilizou-se metodologia descrita por Wiegel e Glazebrook (1989). Tendo em vista que o mutante *jai1-1* é fêmea estéril (LI et al., 2004), este foi utilizado como doador de pólen para os cruzamentos.

A figura 2 descreve o processo de geração de duplos mutantes, usando aqui a mutação *dpy* como exemplo. Dessa forma, plantas *dpy* receberam o pólen de *jai1-1*, produzindo então a geração F1, a qual sempre é heterozigota para *jai1-1* (pois os receptores de pólen são *Jai1-1/Jai1-1*) e heterozigota para a outra mutação hormonal (exemplificando com a mutação *dpy*, sempre teremos *Dpy/Dpy*, pois o mutante *jai1-1/jai1-1* é homozigoto dominante para *Dpy/Dpy*), sendo que dessa forma, a geração F1 não apresenta fenótipo de nenhuma das mutações. Essa geração foi deixada para auto-fecundação, gerando então plantas F2 na proporção 9:3:3:1, sendo 1:15 a frequência de plantas *dpy/dpy jai1-1/jai1-1* que é o duplo mutante em questão.

Figura 2 – Esquema de obtenção de duplos mutantes (exemplificado para a obtenção do duplo mutante *dpy/dpy jai1-1/jai1-1*). Os números abaixo do genótipo da geração F2 representam a frequência esperada

2.2.4.2 Seleção dos duplos mutantes

Após ser produzido, o duplo mutante precisou ser selecionado em meio a uma população segregante. Tal seleção foi feita buscando o fenótipo das duas mutações em questão em uma única planta. Para a seleção da mutação *jai1-1* foi utilizado o teste de sensibilidade ao MeJA descrito no tópico 2.2.2. Para a seleção da mutação *dpy* foram buscadas plantas anãs e com folhas enroladas (Tabela 1).

2.2.4.3 Parâmetros analisados

A fim de verificar uma possível interação hormonal, foram analisados nos duplos mutantes todos aqueles parâmetros outrora descritos no tópico 2.2.3 que se mostraram alterados em *jai1-1* e no mutante candidato selecionado. Características que não se mostravam alteradas em nenhum dos mutantes não foram re-analisadas.

A presença de um fenótipo aditivo, ou seja, aquele onde a característica observada é basicamente o somatório do observado nos mutantes simples demonstra que os hormônios atuam em vias diferentes para a geração daquele caractere. Porém, um fenótipo epistático, ou seja, aquele onde a característica de um mutante suprime a de outro, demonstra uma atuação hormonal na mesma via, o que confirma o

estabelecimento de interação hormonal para a geração daquele caractere (CARVALHO, 2008).

2.2.4.4 *quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)*

Visando elucidar determinados genes que possam estar sendo mais ou menos expressos nos duplos mutantes e pontuar possíveis nódulos de *cross-talk* entre os dois hormônios envolvidos, utilizou-se a técnica de *quantitative Polymerase Chain Reaction* (ou *Real Time quantitative PCR*).

Para tal, o RNA total foi extraído dos genótipos selecionados utilizando o método do Trizol (SIMMS; CIZDZIEL; CHOMCZYNSKI, 1993). Sendo assim, 300mg de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, adicionando-se 1mL de reagente de Trizol antes de descongelar, sendo então transferido para tubos *eppendorf*, os quais foram rapidamente vortexados. Após ser incubada a temperatura ambiente por 5min, a solução foi centrifugada a 11400 rpm, por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi coletada, sendo transferida para novo tubo, adicionando-se 200 µL de clorofórmio, sob agitação intensa por 15 s e posterior incubação a temperatura ambiente por mais 5 min. Seguiu-se então nova centrifugação usando os mesmos parâmetros supracitados.

A fase aquosa agora obtida foi novamente transferida para *eppendorf* novo, onde o RNA total foi precipitado com isopropanol (~0,5 mL), seguido de nova centrifugação a 11400 rpm, por 10 min a 4°C. O pellet foi então lavado com 1 mL de etanol 75% e seco a 37°C. O RNA total foi re-suspenso em 30µL de água contendo 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC – Água livre de RNAses) e armazenado em freezers -80°C. A quantificação de RNA foi feita através de espectrofotômetro, sendo calculada em µg/mL. Para a eliminação do DNA foi utilizado 3 µg do RNA total, 1 µL da enzima DNase I, 1 µL do tampão da enzima, 0,5 µL de RNase OUT, completado para 10 µL com água DEPC. A reação foi mantida a 37°C por 30 min., sendo em seguida adicionado 1 µL de EDTA (25mM) a cada amostra, sendo transferidas para 65°C por 10 min, afim de inativar as enzimas. A confirmação da presença de RNAs na amostra foi feita utilizando corrida em gel de agarose a 1%.

Com o RNA livre de DNA, seguiu-se a síntese da fita de cDNA (seguindo protocolo da Promega). Para tal, 10 µL de RNA tratado foi adicionado a 1 µL de primer

oligo dT e incubado a 70°C por 5 min., seguido de posterior resfriamento a 4°C. Em tal reação adicionou-se posteriormente 3 mM de MgCl₂, 1 µL de dNTPs, 0,5 µL de RNase OUT e a enzima transcriptase reversa da Promega, completando-se para 20 µL com água DEPC 0,01%. Ao final desse processo, as fitas de cDNA podem ser utilizadas para reação com os primers específicos em qPCR. O ciclo da reação de PCR para a síntese do cDNA foram: 95°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s, terminando com 72°C por 5 min.

Seis genes foram escolhidos para o propósito: Dois fazem parte da via de biossíntese do ácido jasmônico – OPR3: *OXOPHYTODIENOIC REDUCTASE3* (STRASSNER et al., 2002) e AOC: *ALLENE OXIDE CICLASE* (ZIEGLER et al., 2000); dois são conhecidamente expressos em resposta a herbivoria pela via do ácido jasmônico: PI-I: *PROTEINASE INHIBITOR I* (YOUNG et al., 1994) e PI-II: *PROTEINASE INHIBITOR II* (GADEA et al., 1996) e dois possivelmente envolvidos com a biossíntese do metabólito secundário zingibereno: SSY: *SESQUITERPENE SYNTHASE* (SGN) e ZIS: *α-ZINGIBERNE SYNTHASE* (DAVIDOVICH-RIKANATI et al., 2008). Como referência foi utilizado o *housekeeping* gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH – ZHONG; SIMONS, 1999). Os *primers* foram desenvolvidos usando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), tendo confiabilidade averiguada no programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) e BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As seqüências e o número de acesso no GenBank para tais se encontram descritos na tabela 4.

As reações de *qPCR* foram conduzidas em termociclador RotorGene 3000 (Cobertt Research, Austrália), contendo volume final de 10 µL, sendo 5 µL de Platinum SYBR GREEN *qPCR* SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,5 µL de cada um dos primers e 1 µL de cDNA. O ciclo da reação de *qPCR* foram: 50 °C por 2 min, 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. Ao final das reações uma curva de melting foi realizada (72 a 95°C) para determinar a especificidade dos primers.

As análises de expressão foram realizadas utilizando o programa Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0. Para tal, mudanças na expressão gênica foram analisadas através de comparação dos genótipos com MT em função dos transcritos para o gene de referência (GAPDH), segundo a metodologia do $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN,

2001). Diferenças significativas foram baseadas nos limites de 0,24 e 2,8 propostos por Benidez et al. (2005). O experimento foi realizado em triplicata para todos os genes descritos.

Tabela 4 – *Primers* utilizados nas reações de qPCR

Gene	Seqüência	N. Acesso*	Referências
OPR3	5'-TCG CGT AGG CGT TAG AGT TT-3' 5'-GCC AAG GCT GAG TGG ATT AG-3'	AJ278332	Strassner et al. (2002)
AOC	5'-TTC TAC TTC GGC GAT TAC GG-3' 5'-TGC TGC AAT TTC ACT TGA CC-3'	AJ272026	Ziegler et al. (2000)
PI-I	5'-TTG CTC TCC TCC TTT TAT TTG G-3' 5'-GCA AGC CTT GGC ATG TTC-3'	L21194	Young et al. (1994)
PI-II	5'-ATC CTA ACA TTT GCC CCT CA-3' 5'-GTG CAA CAC GTC GTA CAT CC-3'	X94946	Gadea et al. (1996)
SSY	5'-AAG TTC ACC GAT GAC CAA GG-3' 5'-CTG AAT TGT GCT GCC TCG TA-3'	SGN**	SGN**
ZIS	5'-ATG CGA ACC CTA CTT TGG TG-3' 5'-ACC ACC TCG ATA AGC GTT TG-3'	AY693646	Davidovich-Rikanati et al. (2008)

*=Número de acesso relativo à seqüência depositada no GenBank - NCBI

**=Unigene obtido na base de dados da SOL GENOMICS NETWORK (SGN)

É de conhecimento que genes da via de biossíntese de JA (como alguns dos genes aqui testados: OPR3 e AOC) têm suas expressões induzidas poucas horas após lesões, como aquelas causadas por insetos durante ação de herbivoria (LI et al., 2004). A maior expressão dessas ocorre para que haja maior biossíntese de JA, e dessa forma, uma amplificação de mecanismos de defesa controlados por esse hormônio, como por exemplo, a maior expressão de PI-I e PI-II (também aqui testados). Mutantes defectivos na biossíntese ou na transdução de sinal de JA geralmente não apresentam nenhum tipo de resposta a lesões, tornando a planta menos responsiva e, dessa forma, mais atacada por herbívoros (CHEN; JONES; HOWE, 2006; HOWE et al., 1996; LI et al., 2004).

Visando avaliar se os genótipos testados apresentavam alteração nos níveis de respostas a lesões, ou seja, maior ou menor expressão de genes da via de biossíntese

e de genes responsivos a JA simulou-se esse tipo de dano em cada um dos genótipos testados. Para tal, com o auxílio de um bisturi, uma lesão foi causada na nervura central de uma folha do terço médio (HOWE et al., 1996). O RNA total foi então extraído das plantas 24 h após a lesão, da mesma folha onde essa foi causada. Os tratamentos foram chamados de “genótipo lesionado”, sendo comparados sempre com o gene referência (GAPDH) de MT não lesionado.

Os experimentos de *qPCR* foram realizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas, do prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira.

2.2.5 Resistência a herbivoria

Para averiguar a real função dos tricomas e aleloquímicos na defesa a herbivoria em tomateiro, os genótipos com maiores alterações nestas características, bem como os duplos mutantes desenvolvidos, foram submetidos a testes de herbivoria com o inseto polífago *Spodoptera frugiperda* e com o inseto herbívoro de tomateiro *Tuta absoluta*.

2.2.5.1 Teste com *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

S. frugiperda é um inseto polífago de fácil obtenção e amplamente utilizado em experimentos de herbivoria (CARLSON et al., 2001; CARROLL et al., 2006). Para o teste com este artrópode, duas metodologias foram utilizadas, o teste de repelência com liberdade de escolha (aquele onde o inseto pode escolher a planta de sua preferência) e o teste sem liberdade de escolha (aquele onde o artrópode não escolhe a planta de sua preferência) (SILVA, 2006).

Para o teste com liberdade de escolha recortaram-se quadrados com área de 4,64cm² de folhas de diferentes genótipos (MT x mutante analisado). Tais quadrados foram dispostos lado a lado dentro de caixas gerbox sendo que cada caixa recebeu um quadrado foliar de cada genótipo (MT e mutante analisado) e três lagartas em primeiro *instar*, (obtidas no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle com o prof. Dr. Celso Omoto) posicionadas entre os dois quadrados. Uma folha de papel filtro embebido em água foi colocada dentro das caixas para manter a umidade interna. O experimento foi conduzido durante cinco dias, após o qual os quadrados de folhas

foram digitalizados, obtendo-se então sua área final utilizando o programa QUANTI. Foram utilizadas 20 caixas gerbox para cada conjunto de genótipos testados (MT x mutante analisado). A figura 3 exemplifica o experimento com chance de escolha.

Figura 3 – Experimento com chance de escolha, onde dois quadrados de 4,64cm² de folhas de diferentes genótipos (MT x mutante analisado) são posicionados lado a lado. As lagartas são colocadas no pequeno quadrado branco entre as duas folhas, podendo escolher qual folha herbivorar. Após cinco dias, a área final dos quadrados é analisada

Para o teste sem chance de escolha, folhas dos diferentes genótipos testados foram destacadas e colocadas dentro de frascos de vidro contendo apenas uma lagarta em primeiro *instar*. Somente uma folha de cada genótipo foi colocada por frasco, sendo trocada somente após quase total herbivoria pela lagarta. Após nove dias, as lagartas tiveram seus pesos avaliados. Para cada genótipo analisado foram utilizados vinte frascos, totalizando, portanto, vinte lagartas por genótipo.

Tanto o experimento com liberdade de escolha quanto o sem liberdade de escolha foram conduzidos a temperatura de aproximadamente 27°C e fotoperíodo de aproximadamente 12h luz.

2.2.5.2 Teste com *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae)

Apesar das facilidades de se trabalhar com *S. frugiperda* (tamanho da lagarta, facilidade de obtenção, entre outros), o fato de este ser um inseto generalista pode ocasionar resultados pouco expressivos para bioensaios visando observar a ação de metabolitos secundários espécie-específicos. Dessa forma, utilizou-se também o teste de herbivoria com uma das principais pragas de tomateiro, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (GONÇALVES-GERVÁSIO et al., 1999; LEITE et al., 1999).

Devido ao seu pequeno tamanho, culminando em baixa mobilidade, somente o teste sem liberdade de escolha foi realizado para *T. absoluta* (BORGONI; CARVALHO, 2006). Para tal, um folíolo do genótipo testado foi colocado dentro de uma caixa gerbox, a qual continha um papel filtro saturado com água destilada. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico, em cada folíolo colocaram-se quatro lagartas de *T. absoluta* recém-nascidas (1º instar – obtidas no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas do prof. Dr. Jose Djair Vendramim). Foram utilizadas cinco caixas por genótipo, em quatro repetições, totalizando 80 lagartas por tratamento.

Lagartas mortas após o primeiro dia de experimento foram substituídas, pois a manipulação inicial pode ocasionar na morte dos insetos. A cada dois dias então, as folhas foram avaliadas em busca de lagartas mortas, as quais foram retiradas obtendo-se assim os dados de mortalidade. Os insetos foram mantidos na placa durante oito dias. Após esse período, as lagartas ainda vivas foram retiradas das minas com ajuda de uma agulha e pesadas. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições de temperatura e luminosidade acima descritas para o experimento com *S. frugiperda*.

2.2.6 Análise estatística

Para todos os experimentos citados foram calculadas média e erros padrão, os quais foram diferenciados segundo o teste-T de Student a 5% de significância. Dados não-paramétricos foram comparados segundo teste de chi-quadrado (χ^2). Todos os dados foram avaliados no programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

2.3 Resultados

2.3.1 Quantificação de tricomas de baixa densidade em diferentes mutantes hormonais

A quantificação de tricomas em todos os genótipos analisados mostrou que os tricomas tipo I, III e VII estão presentes em baixa densidade, com menos de 50 tricomas por cm². As tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos para tais quantificações nas face adaxial e abaxial das folhas respectivamente.

Tabela 5 – Quantificação de tricomas glandulares (Tipos I e VII) e não-glandulares (Tipo III) de baixa densidade na superfície adaxial de MT e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das medias representam erro padrão

Genótipos	Densidade de tricomas (tipo.cm ⁻²)								
	I			III			VII		
MT	06,16	±0,57		07,60	±1,05		32,24	±6,70	
<i>epi</i>	05,00	±0,93		01,00	±0,68	*	04,25	±1,69	*
<i>jai1-1</i>	01,29	±0,45	*	02,47	±0,83	*	18,00	±2,06	
<i>pro</i>	02,00	±0,18	*	00,13	±0,13	*	01,60	±0,56	*
<i>Nr</i>	10,20	±7,24	*	01,70	±0,55	*	07,30	±1,22	*
<i>not</i>	09,00	±5,10	*	01,10	±0,32	*	11,90	±1,78	*
<i>gib3</i>	23,68	±3,29	*	04,21	±1,08	*	27,16	±3,09	
<i>dgt</i>	15,65	±7,13	*	04,94	±1,07		29,59	±2,85	
<i>dpy</i>	16,80	±10,42	*	03,10	±1,11		21,40	±3,95	

Tabela 6 – Quantificação de tricomas glandulares (Tipos I e VII) e não-glandulares (Tipo III) de baixa densidade na superfície abaxial de MT e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão

Densidade de tricomas (tipo.cm ⁻²)						
Genótipos	I		III		VII	
MT	02,42	±0,57	05,86	±0,80	19,63	±3,54
<i>epi</i>	03,75	±0,93	01,25	±0,79 *	01,50	±0,81 *
<i>jai1-1</i>	02,40	±0,45	03,41	±0,86 *	08,94	±2,61 *
<i>pro</i>	00,27	±0,18 *	01,87	±0,46 *	14,40	±1,97
<i>Nr</i>	03,20	±0,72	01,60	±0,45 *	16,20	±2,88
<i>not</i>	02,10	±0,55	02,80	±0,54 *	28,10	±2,93
<i>gib3</i>	06,74	±1,75 *	07,79	±1,08	50,94	±4,82 *
<i>dgt</i>	05,41	±0,67 *	03,29	±0,69 *	35,76	±10,72
<i>dpy</i>	11,40	±1,80 *	11,20	±1,65 *	69,20	±8,63 *

Uma vez que a densidade desses tipos de tricomas se mostrou baixa, ela não é capaz de prover poder estatístico acurado que sirva como base para estimar diferenças entre os genótipos. Por esta razão, apenas os tricomas de alta densidade (Tipos V e VI, os quais apresentam mais de 500 tricomas por cm²) foram levados em conta durante a análise comparativa entre os genótipos. Interessantemente, a maioria dos resultados obtidos para os tricomas tipo I, III e VII seguem padrões semelhantes aqueles obtidos para os tricomas V e VI. Todos os tipos de tricoma observados em MT se encontram demonstrados na figura 5A-D (sendo 5A: Tricoma tipo I, 5B: tricoma tipo III, 5C: tricoma tipo V e 5D: tricomas tipo VI e VII – a figura 5A apresenta ainda dois tricomas tipo VI os quais perderam suas cabeças glandulares, permitindo a observação de suas hastes triangulares). Uma vez que essa figura apresenta também imagens de microscopia eletrônica de varredura de alguns dos genótipos analisados, ela será apresentada mais adiante.

2.3.2 Quantificação de tricomas não glandulares (NG) de alta densidade (tipo V)

Todos os dados para a quantificação do tricoma tipo V, um tricoma não-glandular (NG) estão apresentados na figura 4A e 4B, onde 4A é a densidade deste tricoma na face adaxial e 4B na face abaxial.

Um padrão interessante foi observado para densidade deste tricoma NG em todos os genótipos: É possível concluir que há um número maior de tricomas NG na face abaxial das folhas do que na face adaxial (o qual pode ser concluído apenas observando o eixo das ordenadas nas figuras 4A e 4B). Nota-se pela figura 4A que na face adaxial a densidade do tricoma tipo V é de aproximadamente 100/cm² no mutante mais piloso (*dpy*), enquanto que na outra face (Figura 4B) a densidade deste tricoma é aproximadamente 2,5 vezes maior no genótipo de menor densidade (*epi*).

Um dado interessante pode explicar esse padrão observado: Em quantificação estomática realizada utilizando os mesmos *imprints* feitos para quantificação de células nos mutantes, notou-se que a densidade estomática na face abaxial é muito maior do que na face adaxial em todos os genótipos. Apenas para comparação, MT apresenta uma média de 19,11±4,87 estômatos/cm² na face superior e 325,96±65,29 estômatos/cm² na face inferior de suas folhas. Como se sabe que os tricomas podem reduzir a transpiração das plantas (ISHIDA et al., 2008), é possível que a elevada taxa de tricomas NG na face abaxial, ou seja, naquela que tem mais estômatos, sirva como uma barreira física que mantém a camada limítrofe, levando a uma menor transpiração. Idéia semelhante já foi levantada para *Datura wrightii* (SMITH II; HARE, 2004).

Uma interessante característica na densidade de tricomas foi observada no mutante superprodutor de etileno *epi* (FUJINO et al., 1988), onde se observou uma severa redução de densidade do tricoma NG em todas as faces. Comparando com MT, o número de tricomas tipo V em *epi* é mais de 10 vezes menor na face abaxial das folhas e quase oito vezes menor na face adaxial ($p < 0,001$). Uma distinção no padrão de tricomas para MT e *epi* pode ser feita na observação da foto de microscopia eletrônica de varredura de tais genótipos demonstrada na figuras 5E (MT) e 5F (*epi*).

Figura 4 – Densidade de tricomas tipo V (não-glandulares) por cm² na face adaxial (A) e abaxial (B) da cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura dos tipos de tricoma encontrados em *L. esculentum*: **A)** Tricoma G tipo I (barra=50µm); **B)** Tricoma NG tipo III (barra=50µm); **C)** Tricoma NG tipo V (barra=20µm); **D)** Tricomas G tipo VI e VII (barra=20µm). Duas hastes de tricoma tipo VI (sem cabeças glandulares) demonstrando seu formato triangular são mostradas em **A** próximo do tipo I. A densidade de tricomas na face adaxial dos mutantes hormonais é demonstrada em **E)** Micro-Tom; **F)** *epi*; **G)** *dgt*; **H)** *jai1-1* e **I)** *dpy*. Para E-I, barras=200 µm

A alteração na densidade de tricomas pode ocorrer de duas maneiras: Diretamente, quando mais células recebem este “destino celular” ou indiretamente, através da alteração na área das células epidérmicas, gerando maior ou menor número total de células epidérmicas (TRAW; BERGELSON, 2003). É conhecido que o etileno pode estar envolvido indiretamente na formação de tricomas, afetando a divisão de células epidérmicas (KAZAMA et al., 2004). A avaliação da área celular utilizando a técnica de *imprints* demonstrou que a área das células de *epi* é maior que MT nas duas faces da folha (Figura 6, 7A e B), sugerindo que *epi* pode estar reduzindo a densidade de tricomas indiretamente, através da indução de uma maior área celular. Interessantemente, nenhuma alteração expressiva no número de tricomas NG nem na área celular (Figura 6) foi observada em *Nr*, o mutante pouco sensível a etileno (WIKINSON et al., 1995).

Figura 6 – Área celular (μm^2) na face adaxial (A) e abaxial (B) da cv. MT e mutantes hormonais mensurada através da técnica de *imprints* (WEYERS; JOHANSEN, 1985). Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

Figura 7 – *Imprints* de células epidérmicas da face abaxial das folhas. **A)** MT; **B)** *epi*; **C)** *pro*; **D)** *gib3*; **E)** *dgt* e **F)** *dpy*. Para melhor visualização, as imagens tiveram suas cores invertidas (barras=100 μm)

Faz-se a sugestão que mais estudos sejam realizados para os mutantes em etileno, em especial *epi*, uma vez que uma rápida visualização de folhas de idades diferentes deste mutante demonstrou que as folhas mais novas apresentam um mesmo número de tricomas que MT, ao contrário das folhas de idade média e mais velhas, onde o número de tricomas é altamente reduzido em comparação com MT. A figura 8 demonstra uma folha nova e pilosa de *epi* (Figura 8A), ao lado de uma folha de meia idade e glabra da mesma planta (Figura 8B). Uma vez que a densidade de tricomas é dependente da idade das folhas (LI et al., 2004), propõe-se aqui que o etileno possa estar envolvido também em algum processo de senescência de tricomas.

Figura 8 – Comparação na densidade de tricomas de *epi*. **A)** Folha nova e pilosa, **B)** Folha de meia idade e glabra. As duas fotos foram capturadas utilizando folhas da mesma planta (Barras = 100µm)

É sabido que as giberelinas (GA) promovem a formação de tricomas em *Arabidopsis thaliana* (PERAZZA; VACHON; HERZOG, 1998). A mensuração realizada no mutante *pro*, um mutante em DELLA que exibe fenótipo de resposta constitutiva a GA (BESSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008) demonstrou que GA pode agir diferentemente para tomate, uma vez que este mutante apresentou menor densidade do tricoma NG na face adaxial de suas folhas. Nenhuma alteração foi observada na face abaxial, onde, interessantemente, *pro* apresenta uma maior área celular que MT (Figuras 6B e 7C), postulando o papel de GAs na expansão e divisão celular. Os resultados obtidos com o mutante “oposto” em GA, *gib3*, incapaz de produzir este hormônio (KOORNNEEF et al.,

1990), clarificam os resultados obtidos para *pro*, e reafirmam o papel de GA na alteração da área celular. Observou-se que as células de *gib3* tem uma área significativamente menor que MT nas duas faces das folhas (Figuras 6 e 7D), o que explica a maior densidade de tricomas tipo V observados na face abaxial deste mutante. Apesar de não ser observada nenhuma alteração na face adaxial de *gib3*, os resultados com os mutantes em GA sugerem que este hormônio promove a expansão celular, alterando a densidade de tricomas indiretamente.

O efeito indireto da área celular no número de tricomas também foi observado para o mutante pouco sensível a auxina *dgt* (OH et al., 2006). A área das células epidérmicas desse mutante corresponde a aproximadamente 72% da área das células de MT para a face adaxial (Figura 6A) e 63% para a face abaxial (Figura 6B e 7E) ($p < 0,001$). Concomitantemente, *dgt* demonstra uma maior quantidade de tricomas NG nas duas faces (Figura 4). O fenótipo de alta densidade de tricomas NG de *dgt* pode ser visualizado na figura 5G. Somente para comparação, o número de tricomas tipo V é 123% maior que em MT para a face de baixo das folhas ($p < 0,001$). Tais resultados levam a conclusão que a auxina também está envolvida na alteração do número de tricomas NG, porém, indiretamente, através da expansão celular.

O mutante em ácido abscísico (ABA) *not*, o qual é defeitivo para uma enzima NCED, levando a baixos níveis endógenos de ABA (BURBIDGE et al., 1999) também apresentou uma área celular menor que MT (Figura 6). A densidade de tricomas NG em *not*, porém, não demonstrou nenhuma alteração em relação a MT.

Uma vez que os jasmonatos (JA) participam efetivamente como reguladores de respostas de defesa contra ataque de herbívoros (HOWE et al., 1996; LI; LI; HOWE, 2001), o papel desse hormônio na formação de tricomas é melhor entendido. Os resultados obtidos para o mutante insensível a JA *jai1-1* (LI et al., 2004) mostram que esse é falho na formação de tricomas NG, uma vez que houve redução na densidade de tricomas NG na face abaxial (Figura 4) de forma direta, ou seja, sem alterar a área celular (Figura 6), o que é uma evidencia direta da importância desse hormônio na formação desse caractere anti-herbivoria (HOWE et al., 1996; LI; LI; HOWE, 2001).

Outra evidencia direta de um hormônio controlando tal caractere foi obtido na quantificação de tricomas NG para o mutante defectivo na formação de brassinosteróides (BR's), *dpy* (KOKA et al., 2000). O número de tricomas tipo V foi promovido nas duas faces de *dpy*, sendo significativamente maior que MT (aproximadamente 179% do observado para esse último – $p < 0,001$), sem nenhuma alteração na área das células epidérmicas (Figura 6 e 7F). Dessa forma, as folhas de *dpy* apresentam característica pilosa, como observado para sua face abaxial mostrada em 5G. Interessantemente, a promoção de alguns tipos de tricomas em um mutante insensível a brassinosteróide (*bri1*) já foi outrora observado em *Arabidopsis* (PERAZZA; VARCHON; HERZOG, 1998).

Os resultados para tricomas NG aqui obtidos sugerem a função de BR's como reguladores negativos e jasmonatos como reguladores positivos da formação de tricomas. Os outros hormônios parecem alterar a densidade de tais tricomas indiretamente, através da alteração da área celular. Um melhor entendimento do verdadeiro papel dos hormônios na defesa contra herbivoria foi obtido com a quantificação de tricomas glandulares, uma vez que esses tricomas são provavelmente importantes na defesa contra herbivoria (CARTER; GIANFAGNA; SACALIS, 1989; LI et al., 2004).

2.3.3 Quantificação de tricomas glandulares (G) de alta densidade (tipo VI)

A densidade do tricoma tipo VI, um tricoma glandular (G), se encontra na figura 9, onde 9A e 9B são, respectivamente, densidade deste tricoma na face adaxial e abaxial das folhas. De forma oposta ao observado para o tricoma NG, a densidade de tricomas G, de modo geral, é maior na face adaxial dos genótipos que na abaxial. A face adaxial deve ser preferencialmente utilizada pelos insetos como área para pouso, e possivelmente ovoposição. Isso justificaria um maior número de tricomas glandulares nessa, uma vez que o importante papel dos tricomas G na defesa a herbivoria é altamente conhecido (CARTER; SACALIS; GIANFAGNA, 1989; LIN; TRUMBLE; KAMAMOTO, 1987).

A quantificação do tricoma tipo VI em *jai1-1* mostrou resultado similar ao outrora obtido por Li et al. (2004), onde se observou que *jai1-1* é defectivo na formação desse.

Figura 9 – Densidade de tricomas tipo VI (glandulares) por cm² na face adaxial (A) e abaxial (B) da cultivar Micro-Tom (MT) e dos mutantes hormonais. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

Desse modo, nos resultados aqui demonstrados, a densidade de tricomas tipo VI na face adaxial de *jai1-1* é significativamente menor que MT ($p < 0,001$, ver figura 5H), sendo aproximadamente 11% daquela observada para este último.

Assim como observado para os tricomas NG, a densidade do tricoma tipo VI foi promovido em *dpy*, mas somente na face abaxial, onde a densidade foi significativamente maior que MT. Os resultados para os tricomas G denotam novamente que JA atua como regulador positivo da formação de tricomas, ao contrario de BR's, que atuam como reguladores negativos de tais caracteres. Cabe lembrar que nem *dpy* nem *jai1-1* apresentaram qualquer tipo de alteração no tamanho de células epidérmicas.

Resultados de tricomas semelhantes ao observados para os tricomas NG também foram observados para os mutantes em GA. A promoção da formação de tricomas G foi observada em *gib3*, ao contrario de *pro*, que apresentou redução no numero de tricomas tipo VI quando comparado a MT. Para efeito de comparação, a densidade de tricomas tipo VI na face adaxial é de aproximadamente $178,27 \pm 38,84$ tricomas/cm² em *pro*, indo para $460,08 \pm 52,18$ tricomas/cm² em MT, chegando a $852,63 \pm 84,91$ tricomas/cm² em *gib3*. Porém, uma vez que a área celular de tais mutantes é diferente de MT (Figura 6), nenhum desses resultados pode ser considerado como uma direta evidencia da produção ou redução da formação de tricomas causado pela ausência ou presença de GAs.

Interessantemente, quando se germinou MT em 100µm de GA₃ (o qual é necessário para germinação de *gib3* – ver seção 2.2.2), também se observou a promoção na formação de tricomas. Esses resultados mostram que a promoção de tricomas em *gib3* pode advir de efeito residual do contato das sementes com GA₃ no período de germinação neste hormônio. Um melhor entendimento do papel das GA's na formação de tricomas poderá ser obtido em mutantes em GA que não necessitem deste hormônio para germinação, evitando assim contato com qualquer tipo de GA exógena.

Como já demonstrado para tricomas NG, o mutante *dgt* também apresentou um maior numero de tricomas G, porém, somente para a face abaxial. Uma vez que *dgt* apresenta maior área celular que MT, tais resultados não podem ser descritos como

uma evidencia direta do papel da auxina na promoção da formação desse tipo de tricomas.

Os resultados obtidos para tricomas G foram similares aos obtidos para tricomas NG também no mutante em etileno *epi*, onde se observou uma severa redução na densidade de tais tricomas (Figura 5 e 6G). O número de tricomas tipo VI em *epi* é significativamente alterado, sendo somente 25,7% e 38% do que o observado para MT na face adaxial e abaxial de suas folhas respectivamente. Porém, como já discutido, tais resultados podem ser efeito indireto do elevado tamanho de células epidérmicas deste mutante (Figuras 6 e 7B). Dados observados para tricomas G nas folhas de *Nr* mostram uma menor densidade, comparado a MT, desse tipo de tricomas na face adaxial das folhas, o que também se mostra para o mutante *not*.

2.3.4 Conteúdo de aleloquímicos

O tomateiro possui uma vasta quantidade de aleloquímicos capazes de interagir negativamente com herbívoros. Dois deles foram quantificados neste trabalho. O primeiro foi zingibereno (zgb), um sesquiterpeno comumente encontrado em altas doses em *Lycopersicon hirsutum* (CARTER; GIANFAGNA; SACALIS, 1989), a qual foi utilizada como forma de validar o método utilizado e como comparação com os outros mutantes. O resultado obtido para a quantificação desse metabólito está demonstrado na figura 10 e, como esperado, o conteúdo relativo de zgb em *L. hirsutum* é maior do que qualquer outro mutante analisado.

Apesar da quantidade de zgb em tomateiro ser baixa (como observado para MT), a quantificação deste metabólito em *dpy* se mostrou elevada (aproximadamente 450% do observado para MT, $p < 0,001$), em níveis semelhantes até a espécie selvagem *L. hirsutum*. Por outro lado, *jai1-1*, *pro* e *gib3* apresentam baixos níveis de zgb. Uma vez que *pro* e *gib3* são mutantes opostos (GA⁺ e GA⁻ respectivamente), os dados obtidos para estes mutantes são inconclusivos. Porém, os dados obtidos para *jai1-1* são interessantes e convincentes, uma vez que Li et al. (2004) também já descreveram baixos níveis de terpenos neste mutante, demonstrando a importância de JA na formação de mecanismos de defesa em tomate. Nenhum outro mutante mostrou qualquer alteração no conteúdo de zgb.

Figura 10 – Conteúdo relativo de zgb por cm² em MT e nos mutantes hormonais. *L. hirsutum*, um produtor de elevados níveis de zgb é demonstrado como comparação. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparado com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

O outro metabólito secundário quantificado no trabalho foram os acil-açúcares. Esse aleloquímico está diretamente envolvido na defesa contra algumas pragas de tomateiro como *Bemisia argentifolii*, e está presente em altas quantidades na espécie selvagem *Lycopersicon pennellii* (NOMBELA; BEITIA; MUÑIZ, 2000), a qual foi aqui utilizada para averiguar a eficiência do método e como comparativo com os mutantes. Uma leve alteração foi observada para os mutantes *jai1-1*, *Nr* e *not* (Figura 11), as quais são estatisticamente diferentes, porém não tão expressivas. A alta quantidade de acil-açúcares em *L. pennellii* demonstrou, como esperado, que o método é aplicável. Tais

resultados demonstram que nenhuma mutação hormonal é capaz de aumentar produção desde aleloquímico.

Figura 11 – Quantificação de acil-açúcar por cm² em MT e nos mutantes hormonais. *L. pennellii*, um produtor de elevados níveis de zgb é demonstrado como comparação. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparado com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

2.3.5 Duplo mutante

Os resultados com os mutantes simples demonstraram que apesar de vários hormônios apresentarem alterações em suas densidades de tricomas quando comparados com MT, a maioria dessas alterações pode ocorrer indiretamente, através de uma maior ou menor área das células epidérmicas. Por outro lado, o mutante defeutivo na produção de BR, *dpy* mostrou não somente uma elevada densidade de tricomas sem alteração de área das células epidérmicas, como também uma maior

quantidade de zgb. Essas características são ainda opostas àquelas observadas para o mutante em JA, *jai1-1* (baixo número de tricomas e baixa quantidade de zgb) sugerindo que tais hormônios possam atuar em mesmas vias na formação de tais caracteres. Sendo assim, um duplo mutante entre *jai1-1* e *dpy* foi obtido, como forma de analisar uma provável interação hormonal.

2.3.5.1 Produção e seleção do duplo mutante

A ausência de fenótipo das duas mutações (*dpy* e *jai1-1*) na geração F1 demonstrou que o cruzamento entre tais mutantes havia sido corretamente realizado. Como é possível observar na figura 12, a geração F1 não apresenta o nanismo e as folhas enrugadas característicos de *dpy* e é fêmea fértil, diferentemente de *jai1-1*. Isso significa que as duas mutações em questão se encontram em heterozigose, causada pelo cruzamento realizado.

A geração F2, porém, apresentou plantas com as duas mutações (Figura 12), os duplos mutantes, na frequência de 1:15, os quais foram selecionados primeiramente em meio contendo MeJA (como descrito na seção 2.2.2) e posteriormente selecionando-se o fenótipo característico de *dpy*. A tabela 7 mostra o teste de χ^2 (qui-quadrado) para a frequência de aparecimento das duas mutações. Uma vez que o teste de qui-quadrado (gl=1 p=0,05) aceita a hipótese de segregação 3:1 em valores abaixo de 3,841, podemos dizer que a frequência de aparecimento de cada mutação (*jai1-1* e *dpy*) na geração F2 obtida é de 25% para cada mutação em separado e de 6,25% para as duas mutações em uma mesma planta, mostrando que nenhum tipo de epistasia foi observada no que diz respeito à expressão ao fenótipo analisado nas duas mutações (isso é: insensibilidade ao MeJA para *jai1-1* e nanismo e folhas curvadas para *dpy*). Além disso, a frequência de duplos mutantes está de acordo com a ausência de ligação gênica entre as duas mutações, sendo *jai1-1* posicionado no cromossomo 5 e *dpy* no cromossomo 2 (ver tabela 2).

Figura 12 – Mutante *jai1-1* e *dumpy* (*dpy*) e gerações F1 e F2 de cruzamento entre eles. A geração F1 não apresenta fenótipo de nenhuma das duas mutações parentais, se assemelhando a MT (planta sem folhas enrugadas e fêmea fértil). A geração F2 aqui representada, porém, é um duplo mutante, contendo tanto a mutação *dpy* como *jai1-1*

Tabela 7 – Frequência esperada e observada de aparecimento da mutação *jai1* e *dpy* no duplo mutante, seguido pelo teste de qui-quadrado (gl=1 p=0,05)

Genótipo	N	Freq. Esperada	Freq. Observada	χ^2
<i>jai1-1</i>	62	15,5	13	0,403
<i>dpy</i>	52	13	12	0,070

2.3.5.2 Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) no duplo mutante

As tabelas 8 e 9 apresentam resultados para os tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) obtidos na face adaxial e abaxial do duplo mutante respectivamente. Os dados obtidos para a quantificação de tricomas de baixa densidade em MT, *dpy* e *jai1-1*, outrora demonstrados nas tabelas 5 e 6, foram repetidos aqui para facilitar comparação. Apesar de não poderem ser utilizados como ferramenta de grande precisão estatística, é possível observar em tais tabelas, que a densidade de tricomas

de baixa densidade no duplo mutante é, geralmente, a mesma daquele obtida para *jai1-1*, ou seja, uma redução na densidade de tricomas em comparação a MT.

Tabela 8 – Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) na superfície adaxial do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente demonstrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão

Densidade de tricomas (tipo.cm ⁻²)						
Genótipos	I		III		VII	
MT	06,16	±0,57	07,60	±1,05	32,24	±6,70
<i>jai1-1</i>	01,29	±0,45 *	02,47	±0,83 *	18,00	±2,06
<i>dpy</i>	16,80	±10,42 *	03,10	±1,11	21,40	±3,95
<i>dpy</i> x <i>jai1-1</i>	04,31	±0,86	02,46	±1,04 *	10,00	±1,87 *

Tabela 9 – Quantificação de tricomas de baixa densidade (Tipos I, III e VII) na superfície abaxial do duplo mutante *dpy* x *jai1-1*. Dados de MT, *jai1-1* e *dpy* são novamente demonstrados para facilitar comparação. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Valores ao lado das médias representam erro padrão

Densidade de tricomas (tipo.cm ⁻²)						
Genótipos	I		III		VII	
MT	02,42	±0,57	05,86	±0,80	19,63	±3,54
<i>jai1-1</i>	02,40	±0,45	03,41	±0,86 *	08,94	±2,61 *
<i>dpy</i>	11,40	±1,80 *	11,20	±1,65 *	69,20	±8,63 *
<i>dpy</i> x <i>jai1-1</i>	01,69	±0,59	08,15	±1,71	15,23	±2,59

2.3.5.3 Quantificação de tricomas NG de alta densidade (tipo V) no duplo mutante

Os resultados para a quantificação de tricomas NG no duplo mutante (*dpy* x *jai1-1*) se encontram demonstrados na figura 13, onde as letras A e B representam a quantificação realizada na face adaxial e abaxial das folhas deste mutante respectivamente, sendo que os dados obtidos para a mesma quantificação de tricomas em MT, *dpy* e *jai1-1*, também foram repetidos aqui para facilitar comparação.

Interessantemente, as medições para esse tipo de tricoma no duplo mutante mostraram valores semelhantes a *dpy* na face adaxial e semelhantes a *jai1-1* na face abaxial. Esses dados são inconclusivos, pois se pode sugerir uma relação de epistasia de *dpy* sobre *jai1-1* na face adaxial, onde o número de tricomas NG no duplo mutante é semelhante à *dpy* ou uma relação contrária, de epistasia de *jai1-1* a *dpy* na face abaxial, onde o número de tricomas NG é semelhante a *jai1-1*. Os dados descritos para os tricomas G de alta densidade (Tipo VI) clarificaram os resultados aqui obtidos.

Figura 13 – Densidade de tricomas tipo V (não-glandulares) na face adaxial (A) e abaxial (B) do duplo mutante *dpy x jai1-1*. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

2.3.5.4 Quantificação de tricomas G de alta densidade (tipo VI) no duplo mutante

Os resultados para a quantificação de tricomas G no duplo mutante (*dpy* x *jai1-1*) se encontram demonstrados na figura 14, onde as letras A e B representam a quantificação realizada na face adaxial e abaxial das folhas deste mutante respectivamente.

Assim como já observado para parte dos tricomas de baixa densidade, e como sugerido em uma das relações propostas na análise dos dados obtidos para tricomas NG no duplo mutante, o que se observou nos dados obtidos para a quantificação da densidade de tricomas G da alta densidade no duplo mutante é uma alta semelhança com o mutante *jai1-1*. Como se pode visualizar na face adaxial do duplo mutante, o fenótipo piloso de *dpy* é completamente perdido, sendo praticamente idêntico a *jai1-1* para essa característica analisada. Esse padrão se repete ainda na outra face das folhas de *dpy* x *jai1-1*, novamente se assemelhando mais a *jai1-1* que a *dpy*. A figura 15 demonstra microscopia eletrônica de varredura da face adaxial dos genótipos em questão, onde é possível observar tal semelhança.

Os resultados obtidos para a quantificação de tricomas no duplo mutante sugerem, portanto, uma relação de epistasia entre *dpy* e *jai1-1*, onde a característica altamente pilosa das folhas de *dpy* é revertida à característica glabra de *jai1-1* no duplo mutante.

Figura 14 – Densidade de tricomas tipo VI (glandulares) na face adaxial (A) e abaxial (B) do duplo mutante *dpy x jai1-1*. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a densidade de tricomas na face abaxial de A) Micro-Tom; B) *jai1-1*; C) *dpy* e D) *dpy x jai1-1* (Barras=200 μ m). É possível notar que a densidade de tricomas na face adaxial no duplo mutante se assemelha mais a *jai1-1* do que a *dpy*

2.3.5.5 Conteúdo de zingibereno no duplo mutante

A quantificação do aleloquímico zgb no duplo mutante demonstrou resultados congruentes àqueles observados para a densidade de tricomas. Apesar da elevada quantidade de zgb observada em *dpy*, o duplo mutante tem fenótipo característico de *jai1-1*, com baixos níveis deste metabólito, como demonstrado na figura 16. Novamente observa-se uma possível interação de epistasia de *jai1-1* sobre *dpy*.

Figura 16 – Conteúdo relativo de zingibereno no duplo mutante *dpy x jai1-1*. Asteriscos significam diferença estatística comparado a MT Segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). As cores dos asteriscos significam valores maiores (azul) ou menores (vermelho) que MT. Barras de erro = erro padrão

Cabe lembrar que, uma vez que nenhuma alteração significativa nos níveis de açil-açúcares foi observada nos mutantes simples, este aleloquímico não foi quantificado no duplo mutante.

2.3.6 *qPCR*

Visando uma maior compreensão da provável interação entre BR e JA, realizou-se a análise de níveis de transcritos através da técnica de *qPCR*. Os genes analisados, como já discutido na seção 2.2.4.4, fazem parte da via de biossíntese do ácido jasmônico (OPR3 e AOC), ou são genes responsivos a JA (PI-I e PI-II), ou estão provavelmente envolvidos com a biossíntese do metabólito secundário zingibereno (SSY e ZIS).

Primeiramente, a curva de *melting* obtida para todos os genes mostrou uma apenas um pico, o que demonstra especificidade e qualidade dos *primers* desenhados.

O único *primer* que não demonstrou tal especificidade, onde nem mesmo amplificação ocorreu foi aquele desenhado para o gene da α -ZINGIBERENE SYNTHASE (ZIS). A figura 17 mostra a curva de *melting* para o *primer* da ZIS, onde é possível observar vários picos formados em todas as amostras analisadas (exceto MT).

Esse resultado pode ser explicado devido ao fato de que a sequência gênica de ZIS, a qual foi utilizada como base para o desenho do *primer* foi a única não obtida para *L. esculentum*. Essa foi obtida de manjerição (*Ocimum basilicum* L. – Lamiaceae) (DAVIDOVICH-RIKANATI et al., 2008), sendo que nessa planta a enzima cataliza a formação de α -zingibereno. Quando os autores expressaram a enzima em tomate (transgenia), observou-se uma maior produção de zingibereno, o que sugeriu uma possível presença dessa mesma enzima em tomate. Porém, tal resultado sugere que a produção de zgb em tomate não ocorre através da mesma enzima que em manjerição (ZIS), ou que as sequências de ZIS de tomate e de manjerição são diferentes.

Figura 17 – Curvas de *melting* para o gene ZIS. A figura foi obtida utilizando o programa Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0. A letra “L” ao lado do nome do genótipo significa genótipo lesionado. Legenda: dj= *dpy* x *jai1-1*; Branco= reação sem presença de cDNA

Observando agora a expressão dos dois genes da via de biossíntese de JA, OPR3 e AOC (STRASSNER et al., 2002; ZIEGLER et al., 2000), é possível averiguar que não houve nenhuma diferença significativa de expressão entre nenhum dos genótipos analisados, nem mesmo entre genótipos lesionados e não lesionados

(Figura 18) (BENIDEZ et al., 2005). A leve, mas não significativa diminuição na expressão de AOC em *jai1-1* era esperada, uma vez que JA é um hormônio auto-induzido (feed-forward) (FARMER, 2007). Os resultados para os níveis dos transcritos da via de biossíntese permitem realizar determinadas avaliações:

Primeiramente, sabe-se que os genes da OPR3 e AOC fazem parte de um grupo conhecido como genes de resposta breve (ou *early genes*), pois apresentam picos de expressão após 8 a 12 h de tratamento com MeJA ou a lesões por exemplo. Após 24 h, a expressão de genes de resposta breve já retorna a níveis aproximadamente basais (LI et al. 2004). Dessa forma, uma vez que a extração de RNA foi realizada após 24 h da ocorrência da lesão, é correto que não tenha sido observada diferença na expressão de tais genes na presença e ausência de lesões.

Comparando agora os valores de expressão entre os diferentes genótipos, se comprova que a ausência de brassinosteróides (mutante *dpy*) nada afeta a expressão de enzimas da via de biossíntese de JA, o que sugere que uma provável ação de BR's na via de JA, como sugerida para os resultados com os duplos mutantes (todos os itens da seção 2.3.5), é através de genes *downstream* a OPR3 e AOC.

Figura 18 – Expressão relativa dos transcritos dos genes da via de biossíntese de JA (AOC e OPR3) na ausência (-) e presença de lesão (+). Os valores foram estimados através de comparação para o gene de referência (GAPDH) de MT não lesionado

Diferentemente do observado para OPR3 e AOC, a expressão de PI-I (YOUNG et al., 1994) apresentou contrastes alterações entre genótipos. Além disso, uma vez que esse gene apresenta pico de expressão após 24 h de tratamento com MeJA ou lesões (LI et al., 2004) (por isso classificado como de resposta tardia, ou *late gene*), a diferença na expressão desse também foi observada entre alguns genótipos lesionados e não lesionados. A figura 19 demonstra tais resultados.

Como se pode observar (Figura 19), PI-I é mais expresso em condições de lesões e de forma dependente de JA. Tanto em *dpy* como em MT a expressão de tal gene é estimulada na presença de lesões. Porém, tanto em *jai1-1* quanto em *dpy x jai1-1*, não há diferença entre genótipos lesionados e não lesionados, sendo que até os níveis basais são afetados e a expressão nesses dois genótipos é praticamente zero em quaisquer condições.

Comparando agora os genótipos entre si, é possível observar, novamente, uma ação de BR's no controle de um mecanismo de resposta a herbivoria, no caso, da formação de inibidores de protease. O genótipo *dpy* apresentou resposta exacerbada para lesões, onde foi possível observar uma maior expressão de PI-I no mutante *dpy* quando lesionado, comparado com MT lesionado. E novamente, o duplo mutante mostra uma relação de interação epistática de BR em relação a JA, uma vez que o *dpy x jai1-1* apresentou níveis de expressão de PI-I praticamente idênticos a *jai1-1*.

Por algum motivo o qual não foi possível identificar, nenhuma amplificação conseguiu ser realizada para o outro inibidor de protease, PI-II (GADEA et al., 1996).

Figura 19 – Expressão relativa dos transcritos dos gene de resposta a JA (PI-I) e da SESQUITERPENE SYNTHASE (SSY) na ausência (-) e presença de lesão (+). Os valores foram estimados através de comparação para o gene de referência (GAPDH) de MT não lesionado

A figura 19 mostra ainda a expressão do gene da SESQUITERPENE SYNTHASE (SSY) (SGN), um gene que até então não havia sido relacionado nem a lesões nem a JA. Esse gene não apresentou nenhuma alteração entre genótipos lesionados ou não lesionados, porém, níveis baixos de transcritos para SSY foram observados nos genótipos *jai1-1* e *dpy x jai1-1*, o que sugere que esse gene possa estar sobre regulação de JA, porém, através de uma forma independente de BR, uma vez que nenhuma alteração foi observada em *dpy*.

2.3.7 Testes de herbivoria

Uma vez que *jai1-1* e *dpy* mostraram alterações interessantes nas características ligadas a defesa a herbivoria analisadas (densidade de tricomas, conteúdo de zgb e formação de PI's), bem como o duplo mutante entre eles (*dpy x jai1-1*), testou-se a resistência a herbivoria destes genótipos a dois insetos herbívoros, o polígrafo de fácil acesso *Spodoptera frugiperda* (CARLSON et al., 2001; CARROLL et al., 2006) e um

inseto praga específico de tomateiro, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (BORGONI; CARVALHO, 2006).

2.3.7.1 Testes com *Spodoptera frugiperda*

Dois testes foram realizados com *S. frugiperda*. O teste de liberdade de escolha onde as lagartas podem escolher qual das folhas comeriam, e o teste sem liberdade de escolha, onde as lagartas eram alimentadas sempre com folhas do mesmo genótipo.

Os resultados obtidos com o teste com liberdade de escolha estão demonstrados na figura 20. Primeiramente, como é possível observar, o genótipo *jai1-1* é mais selecionado para ser herbivorado que MT. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada na escolha entre o mutante *dpy*, possuidor de alta densidade de tricomas, de zgb e exacerbado produtor de PI's em lesões comparado com MT. Se os resultados com *jai1-1* poderiam ser correlacionados aos baixos valores obtidos para a quantificação de tricomas, zgb e PI's neste genótipo, o mesmo não se aplicou aquele mutante de fenótipo inverso, *dpy*, excluindo uma possível ação de tricomas, aleloquímicos e PI's na defesa contra *S. frugiperda*. Ainda, a comparação de MT com a espécie altamente possuidora de zgb *L. hirsutum* confirma que este aleloquímico não parece estar envolvido na defesa a herbivoria por *S. frugiperda*, uma vez que não houve uma maior preferência por MT quando confrontado com *L. hirsutum*.

Um resultado interessante, que permite explicar melhor o que ocorre com *jai1-1* e *dpy* vem daquele observado para o duplo mutante, *dpy* x *jai1-1*. Como se pode observar na figura 20, o duplo mutante é mais herbivorado até mesmo que *jai1-1*. Uma hipótese para isso pode ser pelo fato de que as folhas de *dpy* podem ser mais nutritivas que as folhas de MT. Dessa forma, pode estar sendo válido para *S. frugiperda* se alimentar de *dpy* mesmo com sua alta densidade de tricomas de zingibereno e de PI's. Uma vez que o duplo mutante mantém as características de *dpy*, porém, sem caracteres de defesa a herbivoria, as lagartas preferem escolher este genótipo, que além de possivelmente ser mais nutritivo, não apresenta defesas.

Figura 20 – Teste de herbivoria com liberdade de escolha, utilizando o inseto polífago *Spodoptera frugiperda*. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). Barras de erro = erro padrão

Resultado semelhante foi obtido para o teste sem liberdade de escolha. Na comparação dos pesos das lagartas, *jai1-1* propiciou um maior peso as lagartas do que MT. *L. hirsutum* e *dpy*, assim como no teste anterior, não demonstraram nenhuma alteração quando comparados com MT (Figura 21). Interessantemente, *S. frugiperda* pode ter sido inicialmente danificada por algo presente em *dpy*, pois no dia três seu ganho de peso foi muito pequeno comparado a MT.

Os dados com o duplo mutante mostram mais uma vez que este genótipo parece ser o mais nutritivo para as lagartas, uma vez que o maior peso obtido no experimento foi daquelas lagartas que se alimentaram deste genótipo. O peso final das lagartas que se alimentaram com *dpy x jai1-1* foi de quase 400% daquele obtido com as lagartas que se alimentaram com MT.

Figura 21 – Peso das larvas (mg) de *S. frugiperda* após 0 (peso inicial), 3, 6 e 9 dias de alimentação com as folhas. A soma das barras significa o peso final. Asteriscos significam diferenças estatísticas do peso final quando comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). Barras de erro = erro padrão

Os resultados obtidos com *S. frugiperda* mostraram que apesar de esta não ser um bom modelo a ser utilizada para testes com tricomas, PI's e aleloquímicos espécie-específicos como pode ser o caso de zgb, este inseto pode ser utilizado para testes com mutantes em ácido jasmônico, uma vez que se alimentou diferentemente de MT do que *jai1-1* e do duplo mutante.

2.3.7.2 Testes com *Tuta absoluta*

O teste de herbivoria utilizando uma praga específica de tomateiro, *Tuta absoluta* (GONÇALVES-GERVÁSIO et al., 1999; LEITE et al., 1999), demonstrou resultados mais correlacionados com a quantificação de tricomas e de zingibereno nos genótipos analisados.

A figura 22 mostra um padrão da ação de *T. absoluta* nas folhas de tomateiro. É possível notar que em folhas de MT após um dia de contato com as traças quase nenhuma lesão (mina) é observada. Porém, apenas sete dias depois, a folha de MT se apresenta completamente herbivorada pelas lagartas, que consomem todo o parênquima da folha, deixando somente a epiderme. Essa observação confirma o já outrora observado por Borgoni, Silva e Carvalho (2003), que propuseram que o consumo do mesofilo foliar dos folíolos de tomate por *T. absoluta* ocorre em escala exponencial.

Figura 22 – Comparativo entre folhas de MT em diferentes dias após contato com *Tuta absoluta*. Após um dia de contato (folha da esquerda) as minas ainda são pouco visíveis. Porém, após oito dias de contato (folha da direita), as lagartas já consumiram quase todo o parênquima foliar

Diferentemente do observado para *S. frugiperda*, a alto nível de zgb, a elevada densidade de tricomas e a produção exacerbada de PI's parecem exercer efeito em *T.*

absoluta. A figura 23 mostra os resultados obtidos para a mortalidade das lagartas (%) deste último, quando se alimentando com os genótipos testados. Já no quarto dia após início do experimento, a mortalidade das lagartas em *dpy* foi aproximadamente três vezes maior que MT ($p < 0,01$). Após os oito dias de experimento, a mortalidade no genótipo pouco produtor de BR foi de cerca de 80%, enquanto que em MT ela não passa de 40%. Ainda, a importância de *zgb* na defesa contra essa praga se mostra verdadeira quando observado o teste realizado com a espécie *L. hirsutum* (possuidora de altos níveis de *zgb*), onde a mortalidade das lagartas chegou a 100% em apenas quatro dias de avaliação.

Figura 23 – Mortalidade (%) de larvas de *Tuta absoluta* após N dias de alimentação com folhas de diferentes genótipos. Asteriscos significam diferenças estatísticas comparadas com MT segundo o teste-T de Student ($p < 0,05$). Barras de erro = erro padrão

A mortalidade obtida para o genótipo *jai1-1* é praticamente a mesma que MT. Uma vez que *jai1-1* apresenta menores níveis de aleloquímicos e densidade de

tricomas, além de não produzir PI's em resposta a lesões, era de se esperar um maior *fitness* das lagartas neste genótipo que em MT, como observado para os testes com *S. frugiperda*. Uma afirmação que se pode fazer é que os atuais mecanismos de defesa presentes em tomateiro não são capazes de causar nenhum dano maior a lagarta. Essa ausência de defesa explicaria o porquê de *T. absoluta* se desenvolva tão bem nesta planta, se tornando uma praga. Dessa forma, um genótipo com menor quantidade de tricomas, aleloquímicos e PI's não apresentaria grande diferença para o tomateiro normal.

Os resultados obtidos para o duplo mutante *dpy x jai1-1* confirmam novamente uma presença de interação epistática de rotas hormonais, uma vez que a alta mortalidade de lagartas observada em *dpy* é completamente revertida a valores semelhantes a *jai1-1* no duplo mutante.

Os dados encontrados para o peso das larvas após os oito dias de tratamento se encontram demonstrados na figura 24. Como mostrado nesta figura, nenhuma diferença estatística foi observada entre os genótipos, apesar de ser notável uma tendência a um menor peso em *dpy* do que nos outros três genótipos testados, os quais foram semelhantes. Novamente, uma grande semelhança entre o obtido em *dpy x jai1-1* comprovam a presença de interação epistática entre as rotas de JA e BR. Não se obtiveram pesos para as lagartas no tratamento com *L. hirsutum*, uma vez que todas as lagartas haviam morrido após quatro dias nesse genótipo (figura 23).

Figura 24 – Peso (mg) de larvas de *Tuta absoluta* após oito dias de alimentação com folhas de diferentes genótipos. Barras de erro = erro padrão

2.4 Discussão

2.4.1 Densidade de tricomas é altamente influenciada por hormônios através de alteração na área celular

Os tricomas são a primeira forma de defesa contra herbivoria encontradas em tomateiro (LARA, 1991). A importância econômica e a perda gerada por pragas na cultura do tomateiro fazem a busca por genótipos com maior quantidade de tricomas uma das maiores fontes de pesquisa em programas de melhoramento de tomateiro (ZALOM, 2003). O trabalho aqui apresentado demonstrou que vários hormônios são capazes de alterar a densidade de tricomas em tomateiro, porém, que tais alterações ocorrem indiretamente, através da alteração na área das células epidérmicas.

Sabe-se que a uma alteração na densidade de tricomas pode ocorrer de maneira direta quando mais células recebem este “destino celular” ou indiretamente através de uma alteração na área das células epidérmicas, gerando maior ou menor número total

de células epidérmicas (TRAW; BERGELSON, 2003). O mutante *epi*, superprodutor de etileno (FUJINO et al., 1988), mostrou uma elevada área celular, e um baixo número de tricomas, sendo um exemplo desta alteração de densidade de tricomas ocorrendo de forma indireta. Apesar do mutante oposto a esse, *Nr*, pouco sensível a esse hormônio (WIKINSON et al., 1995) não ter apresentado uma diminuição na área celular, varias evidencias apontam o papel do etileno em mecanismos de expansão celular. Smalle et al. (1997) observaram que plantas de *Arabidopsis* crescendo em presença de etileno apresentavam crescimento dos hipocótilos devido a um aumento na expansão das células. Essa expansão não ocorria quando o mesmo experimento era conduzido com mutantes insensíveis a etileno, demonstrando a importância desse hormônio na expansão celular. Existem ainda evidencias da atuação do etileno na mudança de orientação de microfibrilas de celulose e microfilamentos levando a expansão celular (LANG; EISINGER; GREEN, 1982).

Assim como o etileno, GA também está envolvido na expansão celular, como observado para o mutante pouco produtor de GA *gib3* (KOORNNEEF et al., 1990) e para o mutante de resposta constitutiva a este hormônio *pro* (BESSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008), os quais apresentaram células menores e maiores que MT respectivamente. A densidade de tricomas nestes mutantes segue o padrão de indução indireta. O mutante que apresentou células pequenas (*gib3*) apresentou, em geral, uma maior densidade de tricomas, ao contrario daquele com as células grandes (*pro*), que tem uma baixa densidade de tricomas. O papel de GA na indução da expansão celular também é conhecido. Trabalhando com milho, Baluska, Parker e Barlow (1993) demonstraram que a ausência de GA causa um desarranjo no padrão dos microtúbulos, fazendo as células ficarem menores. A atuação de GA no arranjo dos microtúbulos e, conseqüentemente na expansão celular é alvo de diversas pesquisas atualmente (SAKIYAMA-SOGO; SHIBAOKA, 1993; WENZEL; WILLIAMSON; WASTENEYS, 2000). GA's também estão envolvidas com o controle da expressão de enzimas xiloglucano-endotransglicosilases (XET's), as quais são responsáveis pela modificação na rede de xiloglucanos das paredes celulares e, conseqüentemente, com a expansão dessa (CHEN; NONOGAKI; BRADFORD, 2002).

Resultado semelhante ao etileno e GA provém do estudo do mutante *dgt*, pouco sensível a auxina (OH et al., 2006), o qual também apresentou área celular menor e, conseqüentemente, maior número de tricomas. A atuação da auxina na expansão celular já é bem conhecida. Ela é responsável pela ativação de bombeadores de prótons que tornam o meio extracelular mais ácido e por conseqüência mais susceptível a ação de expansinas que afrouxam a parede e permitem a expansão celular (FRY, 2006). A ausência de auxina, portanto, dificulta a expansão celular, fazendo com que essas permaneçam com áreas pequenas.

Para o mutante defectivo na produção de ABA, *not* (BURBIDGE et al., 1999), foi observado também uma redução na área celular, mas sem alteração no número de tricomas. O ABA é um hormônio envolvido no fechamento das células guarda, ou seja, ligado a conservação de água nas plantas (LECKIE et al., 1998). A ausência deste hormônio pode levar a uma perda de turgor celular, explicando porque o mutante defectivo na formação de ABA, *not*, apresenta uma menor área celular.

2.4.2 O ácido jasmônico e os brassinosteróides possuem papéis opostos na produção de tricomas, zingibereno e inibidores de protease

Diferentemente do observado para os mutantes em etileno, GA, auxina e ABA, os mutantes em BR e JA mostraram um efeito direto no controle da densidade de tricomas, ou seja, alteram o número de tricomas sem alterar o número de células. Esses dois hormônios também controlaram, antagonicamente, a produção de zgb e a produção de PI's em resposta a lesões.

JA pode ser descrito como o hormônio da herbivoria, pois sua atuação como mediador de respostas a esse tipo de estresse é clara. Porém, apesar de já ser conhecido há quase meio século, tal função de JA foi descrita recentemente, no início da década de 90.

Em 1962 o éster de metil-jasmonato foi isolado pela primeira vez do óleo essencial de *Jasminum grandifolium* (DEMOLE; LEDERER; MERCIER, 1962), porém seus efeitos fisiológicos foram ser conhecidos somente duas décadas depois, já na forma de ácido livre (JA), onde se observou que esse hormônio promovia a senescência e retardava o crescimento (DATHE et al. 1981; UEDA; KATO, 1980). Porém, mesmo

após uma primeira elucidação da via de biossíntese de JA (VICK; ZIMMERMANN, 1984), seus efeitos como mediador de respostas a herbivoria ainda eram desconhecidos. O cenário começou a se alterar no começo dos anos 90, quando Farmer e Ryan (1990) observaram que um inibidor de proteinase era produzido sempre que as plantas eram tratadas com JA exógeno. Esse mesmo inibidor era produzido sempre que as folhas eram lesionadas. A partir de então, a alteração da expressão gênica e de padrões metabólicos se tornou o foco do estudo com JA. Gundlach et al. (1992) notaram um aumento no níveis endógenos de JA quando tratavam suspensões celulares com elicitores de fungo. Esse aumento era procedido por um aumento na formação de proteínas ligadas a defesa química, como a fenilalanina-amonilase. Dois anos depois, o isolamento do primeiro mutante insensível a JA mostrou que este hormônio estava envolvido na defesa contra patógenos necrotróficos (FEYS et al., 1994). Desde então, o trabalho com mutantes em JA vem demonstrando a importância de JA formação da defesa a herbivoria (HOWE et al., 1996). Em 2004 descreveu-se o mutante *jai1-1*, o primeiro mutante insensível a JA em tomateiro (LI et al., 2004). Os autores demonstraram que, assim como observado neste trabalho, a ausência de percepção de JA pelas plantas de tomateiro causa uma diminuição no número de tricomas, menor produção de metabólitos secundários, ausência de produção de PI's e, conseqüentemente, uma maior predação por herbívoros. Diferentemente do trabalho de tais autores, o estudo aqui demonstrado permitiu avaliar especificamente quais tipos de tricomas foram afetados pela insensibilidade ao JA, além de ligar este à produção de um metabólito secundário de comprovada ação anti-herbivoria, o zgb (AZEVEDO et al., 2003). Desse modo, comprova-se ainda mais a importância deste hormônio na resposta a herbivoria. Prova-se que JA promove a formação de tricomas e aleloquímicos, além de estar envolvido na formação de PI's em resposta a lesões.

Diferentemente da comprovada importância altamente conhecida de JA, até o presente trabalho, nada era conhecido para BR na resposta a herbivoria. Apesar de Perazza, Vachon e Herzog (1998) terem observado uma promoção de um tipo de tricoma em um mutante insensível a BR em *Arabidopsis*, nenhum outro trabalho liga BR a tricomas, aleloquímicos ou PI's. O presente estudo, porém, comprova definitivamente que BR está envolvido na defesa a herbivoria, uma vez que o mutante pouco produtor

de BR *dpy* apresentou um elevado número de tricomas, de conteúdo de zgb e exacerbada produção de PI's em resposta a lesões. O que se sugere, portanto, é que BR atua como um regulador negativo na formação de tais características. Interessantemente, os resultados obtidos para o mutante em BR foram completamente opostos aqueles obtidos para o mutante em JA, o que indicou uma provável interação hormonal entre os dois, a qual será discutida mais adiante.

2.4.3 Diferente de zingibereneos, nenhuma alteração hormonal foi capaz de aumentar o conteúdo de Acil-açúcares

Diferentemente do observado para zgb, o teor de acil-açúcares não parece ser expressivamente controlado por hormônios. Apesar de leves alterações em alguns mutantes (ex. *jai1-1*, sugerindo que maiores níveis de JA podem levar a maiores níveis do metabólito), a maioria dos genótipos amostrados apresenta níveis de conteúdo deste aleloquímico semelhantes a MT. Uma hipótese para o que ocorre com acil-açúcar pode não estar centrado no controle hormonal e sim o tipo de tricoma o qual contém esse aleloquímico.

Como observado nos resultados demonstrados, os níveis de açil-açúcar em *L. pennellii* são elevados quando comparados a MT. Tais resultados também já foram descritos por outros autores (GONÇALVES et al., 2007; RESENDE et al., 2002b), onde também se observou que o nível desse aleloquímico é muito baixo em varias cultivares de *L. esculentum*.

O que se sabe é que existe um tipo de tricoma glandular presente em *L. pennellii*, mas ausente em *L. esculentum*, o tricoma tipo IV (LUCKWILL, 1943). A presença deste aleloquímico no tricoma tipo IV explicaria o fato de que baixos níveis tenham sido observados em *L. esculentum* (incluindo os resultados aqui demonstrados para a cultivar MT) e altos níveis em *L. pennellii* (Como levantado por NOMBELA; BEITIA; MUÑIZ, 2003). Essa presunção também explica a ausência de variações expressivas nos mutantes observados, pois os níveis de acil-açúcares em MT já são baixos. Por outro lado, a observação de um alto conteúdo de zgb em *dpy* sugere fortemente que, diferentemente de acil-açúcares, esse aleloquímico não é dependente de tricomas tipo IV (ver CARTER; GIANFAGNA; SACALIS, 1989).

2.4.4 Resultados dos testes de herbivoria demonstram diferentes atuações dos mecanismos de defesa para o inseto polífago *S. frugiperda* e a praga de tomate *T. absoluta*

Diferentes padrões de resultados foram obtidos para o lepidóptero polífago *S. frugiperda* e para a praga específica de tomateiro *T. absoluta*.

Para o inseto polífago, não foi observado nenhuma alteração nos padrões de alimentação quando usando folhas que apresentavam maior número de tricomas e de aleloquímicos (isso é: *dpy* e *L. hirsutum*). Porém, quando utilizados genótipos com mutações para o ácido jasmônico (*jai1-1* e o duplo mutante), observou-se tanto uma maior escolha por tais folhas como um ganho de peso acentuado nas lagartas que se alimentaram com tal. O que se pode concluir com tais resultados é que *S. frugiperda* não é afetada por nenhum dos caracteres de defesa aqui quantificados. Ainda assim, algo controlado por JA, mas que não foi quantificado neste trabalho, como a enzima polifenol-oxidase (PPO) (THALER et al., 1996) por exemplo, pode estar exercendo efeito na lagarta, uma vez que aqueles genótipos insensíveis a JA foram mais herbivorados e deram maior peso a lagarta. Cabe lembrar que esse algo provavelmente não é controlado por BR como o número de tricomas, *zgb* e *PI's*, uma vez que nenhuma alteração foi observada no mutante *dpy*.

Uma vez que *S. frugiperda* não é um herbívoro específico de tomateiro (MALO et al., 2004), este se mostrou não adequado para experimentos com aleloquímicos, *PI's* e tricomas. Porém, apesar dos resultados não terem sido satisfatórios para o teste com esses mecanismos anti-herbivoria, sua facilidade em obtenção e criação e os dados aqui obtidos com *S. frugiperda* mostram que este inseto é um interessante modelo no estudo de mutantes em jasmonato em tomateiro.

Padrões opostos foram observados, porém, em *T. absoluta*, a traça-do-tomateiro, uma praga específica de tomate. As plantas que carregavam mutações para o ácido jasmônico (*jai1-1* e *dpy x jai1-1*), não apresentaram nenhuma alteração na taxa de mortalidade das lagartas quando comparadas a MT. Como já explicitado, uma vez que esse inseto é uma praga de tomate, é provável que os níveis de defesa encontrados neste não sejam capazes de controlar a lagarta. A utilização de genótipos com menor quantidade de defesa ainda (mutantes em JA) não acarretaria nenhuma alteração,

portanto, nessa taxa de mortalidade. Os níveis de mortalidade observados em *jai1-1*, *dpy x jai1-1* e MT podem ser considerados, portanto, basais.

Por outro lado, uma elevada taxa de mortalidade foi observada nos genótipos que apresentavam alta quantidade de tricomas e de aleloquímicos (*dpy* e *L. hirsutum*) e de PI's (*dpy*). Ao contrario de *S. frugiperda*, esses caracteres de defesa exercem alta atuação sobre *T. absoluta*. Apesar de vários trabalhos já demonstrarem a atuação de diversos aleloquímicos de tomate no controle desta praga (ex. GILÁRDON et al., 2001; GONÇALVES-GERVÁSIO et al., 2001; RESENDE et al., 2006), essa parece ser a primeira vez que se demonstra o controle hormonal da produção de um aleloquímico com uma elevada importância econômica, devido a sua atuação em uma praga de tomateiro.

Futuras pesquisas utilizando a interação aqui demonstrada entre BR e JA poderão dar origem a plantas de tomateiro com maior quantidade de tricomas, aleloquímicos e inibidores de proteases, as quais serão menos danificadas pela traça-do-tomateiro e exigirão assim um menor nível de aplicação de defensivos, reduzindo o custo de produção e os danos causados ao meio ambiente.

2.4.5 Interação hormonal entre brassinosteróides e ácido jasmônico

Os resultados obtidos para quantificação de tricomas e para a produção do metabólito zgb e de PI's demonstram que JA controla positivamente a produção de tais caracteres, enquanto BR age de forma contraria, regulando negativamente a produção desses. O duplo mutante *dpy x jai1-1* mostrou que a ação de BR ocorre através da via de JA, uma vez que o alto número de tricomas, o elevado teor de zgb e a produção exacerbada de PI's, todos propiciado pela ausência de BR em *dpy* cai a níveis semelhantes ao mutante insensível a JA, *jai1-1*, no duplo mutante. Tais resultados indicam a interação entre BR e JA na geração da defesa a herbivoria. Apesar de tal interação ter se mostrado clara neste trabalho, poucas informações a respeito desta são disponíveis em literatura, sendo possível isolar poucos experimentos que tornam mais claros os resultados aqui obtidos.

No início do século XXI, uma interessante indicação da uma possível interação JA x BR surgiu. Ao clonarem o receptor de BR em tomate (chamado de tBRI1),

Montoya et al. (2002) observaram que a sequência desse apresentava uma alta semelhança com o receptor do polipeptídeo sistemina (conhecido como SR160), um indutor de defesa e forte ativador da via do ácido jasmônico (CREELMAN; MULLET, 1997; PEARCE et al., 1991). Esses resultados sugerem, dessa forma, que as duas moléculas (BR e sistemina) poderiam fazer uso do mesmo receptor. Dessa forma, a ativação de certas respostas causadas por BR poderiam ocasionar a biossíntese de JA. Porém, o mesmo grupo de autores percebeu, em 2007, que a sistemina continuava desempenhando seu papel mesmo em plantas apresentando mutações em tBRI1, sugerindo que esse polipeptídeo pode ser percebido de outra forma, que não por tBRI1 (HOLTON et al., 2007). Dessa forma, excluiu-se uma possível interação entre JA e BR através de receptores de sistemina.

Resultados mais consistentes sobre possíveis interações BR x JA provém dos estudos de transcriptômica de Müssig et al. (2000) e Goda et al. (2002). Os primeiros observaram maior expressão da enzima 12-oxofitodienoato-redutase3 (OPR3), durante aplicação de BRs. Essa enzima controla um passo chave na biossíntese de JA, convertendo o ácido 12-oxofitodienóico ao ácido ciclopentano 1-octanóico, que é precursor direto de JA (STRASSNER et al., 2002). OPR3 também era mais expressa em tratamentos com aplicação de JA, de forma que os autores sugerem que esse seria um possível link entre a ação de BRs e a biossíntese de JA em *Arabidopsis* (MÜSSIG et al., 2000). Resultado semelhante foram obtidos por Goda et al. (2002) durante análise de *microarrays* de genes expressos durante a aplicação de BR em *Arabidopsis*, porém com a isoforma OPR1.

Interessantemente, os resultados obtidos neste trabalho são inversos aqueles obtidos pelos autores supracitados. Primeiramente, nenhuma alteração de expressão foi observada na expressão dos genes da via de biossíntese de JA em *dpy*. Além disso, diferentemente de *Arabidopsis* onde BR parece ativar a via de biossíntese de JA, os resultados aqui encontrados sugerem que, em tomateiro, BR parece controlar negativamente a via de JA, de uma forma um tanto quanto semelhante ao controle realizado pelo ácido salicílico (SA) nesta mesma via.

Sabe-se que JA e SA atuam antagonicamente. Enquanto a ativação da via de JA ocorre durante a infecção por patógenos necrotróficos, a da via de SA ocorre quando a

planta é infectada por patógenos biotróficos (PIETERSEN; VAN LOON, 1999). Em *Arabidopsis*, a aplicação de SA é capaz de reduzir a formação de tricomas, agindo ainda bloqueando a via de JA (TRAW; BERGELSON, 2003). Mutantes que não respondem ao JA (insensíveis, por exemplo) geralmente apresentam maiores níveis de defesa a patógenos que são combatidos pela via de SA (FEYS et al., 1994). É interessante observar até mesmo insetos como a mosca-branca fazem uso de tal interação, ativando a via de biossíntese de SA para impedir qualquer defesa gerada por JA (ZARATE; KEMPEMA; WALLING, 2007).

Pode-se sugerir que BRs estejam ativando a via de SA para translocação: Sabe-se que por serem pouco solúveis em água, BRs são substâncias pouco translocáveis na planta (SYMONS et al., 2008). Para que possam se movimentar pela planta, os BRs parecem se associar a uma proteína chamada Bet v 1 (MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2003). As proteínas da família de Bet v 1 são presentes em todo o reino vegetal, sendo um homólogo desta encontrado em tomateiro (MARKOVIC-HOUSLEY et al., 2003). O complexo BR+Bet v 1 é mais solúvel em água e permite mais movimentação desse hormônio esteróide. A família proteica de Bet v 1 é ativada em resposta a patógenos em plantas podendo ser induzida justamente pelo SA (ZIADI et al., 2001). Sumarizando, pode-se supor que BR ativam a via de SA para translocar pela planta, porém, com isso inibem a via de JA e suas respostas, como produção de tricomas e aleloquímicos. Obviamente tal afirmativa necessita de maiores testes, mesmo porque, trabalhando com arroz e tabaco, Nakashita et al. (2003) mostraram que a ativação de algumas vias de defesa induzidas por BR contra patógenos bio e necrotróficos são totalmente independente de SA.

A figura 25 resume a interação hormonal proposta neste trabalho. O ácido jasmônico está diretamente envolvido na produção de tricomas, do metabólito secundário zgb e de PI's. A mutação que causa perda de insensibilidade a esse hormônio, *jai1-1*, portanto, leva a uma redução no número de tricomas e do metabólito secundário, além de ausência de produção de PI's em resposta a lesões. De forma antagonica a JA, BR atuam de forma a controlar negativamente a produção de tais caracteres, controlando a via do ácido jasmônico em um ponto *upstream* a *jai1-1*. Uma vez que a mutação *dpy* é defectiva na produção de BR, não há controle negativo da

geração de tricomas, de zgb e da produção de PI's em resposta a lesões. Tais características se mostram em elevados níveis neste mutante, justamente pela ausência de BR. Porém, o controle feito por *dpy* também é dependente de *jai1-1*, uma vez que um duplo mutante entre *dpy* x *jai1-1* mostra fenótipo semelhante a *jai1-1* para tais características.

Figura 25 – Interação hormonal proposta para esse trabalho, envolvendo os hormônios ácido jasmônico e brassinosteróides na formação de tricomas e do aleloquímico zingibereno

3 CONCLUSÕES

- Etileno (como observado para o mutante *epi*), GA (*pro* e *gib3*) e auxina (*dgt*), influenciam a densidade de tricomas para mais ou para menos de forma indireta, controlando o tamanho das células epidérmicas através da expansão celular. Tais hormônios não atuam de forma muito significativa na formação do aleloquímico zgb.
- JA e BR, porém, têm papel direto na formação de tricomas, além de atuarem na formação de zgb e de PI's em resposta a lesões, sendo reguladores positivo e negativo respectivamente da formação de tais caracteres como observado para os mutantes *jai1-1* e *dpy*.
- Além de JA e BR, nenhum outro hormônio parece controlar a produção de zgb em tomateiro.
- Acil-açúcares não parecem ser expressivamente controlados por hormônios em *L. esculentum*. Tais dados podem representar um possível indicio da presença deste aleloquímico em tricoma tipo IV, os quais não são presentes em tomateiro.
- Dados obtidos com duplos mutantes mostram que BR's controlam a produção de tricomas, aleloquímicos e de PI's através do controle da via de JA em um ponto *upstream* a *jai1-1*. Análise de expressão de genes por *qPCR* mostrou que BR's interagem com JA em um ponto *downstream* a AOC e OPR3.
- Resultados com teste de herbivoria mostram que *Spodoptera frugiperda* não é um bom modelo para estudos de tricomas, aleloquímicos e PI's, mas pode ser utilizado em experimentos com mutantes em ácido jasmônico. Por outro lado, a mortalidade de *Tuta absoluta* é maior naqueles genótipos com elevados teores de aleloquímicos, de PI's e elevadas densidades de tricomas, o que mostra ainda o importante papel da interação BR x JA na defesa contra essa praga em tomateiro.

REFÊRENCIAS

- ARAGÃO, C.A.; MALUF, W.R.; DANTAS, B.F.; GAVILANES, M.L.; CARDOSO, M.G. Tricomas foliares associados à resistência ao ácaro-rajado (*Tetranychus urticae* Koch.) em linhagens de tomateiros com alto teor de 2-tridecanona nos folíolos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 81-93, 2000.
- ARROO, R.R.J.; DEVELI, A.; MEIJERS, H.; VAN-DE-WESTERLO, E.; KEMP, A.K.; CROES, A.F.; WULLEMS, G.J. Effect of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 93, p. 233-240, 1995.
- AZEVEDO, S.M.; FARIA, M.V.; MALUF, W.R.; OLIVEIRA, A.C.B.; FREITAS, J.A; Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. **Euphytica**, Wageningen, v. 134, p. 347-351, 2003.
- BALUSKA, F.; PARKER, J.S.; BARLOW, P.W.; A role for gibberellic acid in orienting microtubules and regulating cell growth polarity in the maize root cortex. **Planta**, Heidelberg, v. 191, p. 149-157, 1993.
- BENIDEZ, Y.; BOTELLA, M.A.; TRAPERO, A.; ALSALIMIYA, M.; CABALLERO, J.L.; DORADO, G.; BLANCO, J.M.; Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. **Molecular Plant Pathology**, Bristol, v. 6, p. 425-438, 2005.
- BESSEL, G.W.; MULLEN, R.T.; BEWLEY, J.D. *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 585-593, 2008.
- BIRKENMEIER, G. F.; RYAN, C. A.; Wound signaling in tomato: evidence that ABA is not a primary signal for defense gene activation. **Plant Physiology**. Rockville, v. 117, p. 687-693, 1998.
- BLAUTH, S.L.; CHURCHILL, G.A.; MUTSCHLER, M.A.; Identification of quantitative trait loci associated with acylsugar accumulation using intraspecific populations of the wild tomato, *Lycopersicon pennellii*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 96, p. 458-467, 1998.
- BORGONI, P.C.; CARVALHO, G.S.; Biologia de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em diferentes cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Bioikos**, Campinas, v. 20, p. 49-61, 2006.
- BORGONI, P.C.; SILVA, R.A.; CARVALHO, G.S.; Consumo do mesófilo foliar por *Tuta absoluta* (Meyrick, 1971) (Lepidoptera: Gelechiidae) em três cultivares de *Lycopersicon esculentum* Mill. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 7-11, 2003.

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

CARLSON, G.R.; DHADIALLA, T.S.; HUNTER, R.; JANSSON, R.K.; JANY, C.S.; LIDERT, Z.; SLAVECKI, R.A. The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 57, p. 115-119, 2001.

CARROLL, M.J.; SCHAMELZ, E.A.; MEAGHER, R.L.; TEAL, P.E.A. Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1911-1924, 2006.

CARTER, C.D.; GIANFAGNA, T.J.; SACALIS, J.N. Sesquiterpenes in glandular trichomes of a wild tomato species and toxicity to the Colorado potato beetle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davies, v. 37, p. 1425-1428, 1989.

CARTER, C.D.; SACALIS, J.N.; GIANFAGNA, T.J. Zingiberene and resistance to Colorado potato beetle in *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 37, p. 206-210, 1989.

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

CHATZIVASILEIADIS, E.F.; SABELIS, M.W. Toxicity of methyl ketones from trichomes to *Tetranychus urticae* Koch. **Experimental & Applied Acarology**, New York, v. 21, p. 473-484, 1997.

CHEN, C.C.; HO, C.T. Gas chromatographic analysis of volatile components of ginger oil (*Zingiber officinale* Roscoe) extracted with liquid carbon dioxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 36, p. 322-328, 1988.

CHEN, F.; NONOGAKI, H.; BRADFORD, K.J. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 215-223, 2002.

CHEN, H.; JONES, D.; HOWE, G.A. Constitutive activation of jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 580, p. 2540-2546, 2006.

CHIEN, J.C.; SUSSEX, I.M. Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1321-1328, 1996.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

CUTTING, J.G.M.; BOWER, J.P. Effect of harvest date and applied abscisic acid on browning potential of avocado fruit. **South African Avocado Growers Association Yearbook**, Johannesburg, v. 10, p. 130-132, 1987.

DAN, Y.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.; ARMSTRONG, C.L.; Micro-Tom – A high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 25, p. 432-441, 2006.

DATHE, W.; RÖNSCH, H.; PREISS, A.; SCHADE, W.; SEMBDNER, G.; SCREIBER, K.; Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. **Planta**, Heidelberg, v. 155, p. 530-535, 1981.

DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; LEWINSOHN, E.; BAR, E.; IJIMA, Y.; PICHERSKY, E.; SITRIT, Y. Overexpression of the lemon basil alpha-zingiberene synthase gene (ZIS) increases both mono- and sesquiterpene contents in tomato fruit. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 228-238, 2008.

DAVIES, M.; HAMILTON, G.; LANINI, T. **The importance of pesticides and other pest management practices in US tomato production**. Washington: USDA, National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program, 1996. 10 p. (Document, 2-CA-95).

DE QUATTRO, J.; SENFT, D.; WOOD, M. The whitefly plan-5-year update. **Agricultural Research**, Washington, v. 45, p. 4-13, 1997.

DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmine. **Helvetica Chimica Acta**, Zurich, v. 45, p. 675-685, 1962.

EIGENBRODE, S.D.; TRUMBLE, J.T.; MILLAR, J.G.; WHITE, K.K.; Topical toxicity of tomato sesquiterpenes to the beet armyworm and the role of these compounds in resistance derived from an accession of *Lycopersicon hirsutum* f. *typicum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 42, p. 807-810, 1994.

ELLARD-IVEY, M.; DOUGLAS, C.J. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 183-192, 1996.

FAO. Disponível em <<http://faostat.fao.org/default.aspx>>. Acesso em: 01 out. 2008.

FARMER, E.E. Plant biology: jasmonate perception machines. **Nature**, London, v. 448, p. 659-660, 2007.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 7713-7716, 1990.

FEYS, B.J.F.; BENEDETTI, C.E.; PENFOLD, C.N.; TURNER, J.G. Arabidopsis mutant selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl-jasmonate and resistance to bacterial pathogen. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 751-759, 1994.

FLETCHMAN, C.H.W. **Ácaros de importância agrícola**. 6. ed. São Paulo: Nobel. 1990. 189 p.

FREITAS, J.A. **Resistência genética de tomateiro *Lycopersicon* spp. a mosca branca *Bemisia* spp. mediada por zingibereno contido em tricomas glandulares**. 1999. 193 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

FREITAS, J.A.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; GOMES, L.A.A.; BEARZOTTI, E. Inheritance of foliar zingiberene contents and their relationship to trichome densities and whitefly resistance tomatoes. **Euphytica**, Wageningen, v. 127, p. 275-287, 2002.

FRY, S.C. Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 75, p. 532-536, 2006.

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

GADEA, J.; MAYDA, M.E.; CONEJERO, V.; VERA, P. Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, v. 9, p. 409-415, 1996.

GILARDÓN, E.; POCOVI, M.; HERNÁNDEZ, C.; COLLAVINO, G.; OLSEN, A. Papel da 2-tridecanona e dos tricomas glandulares tipo VI na resistência do tomateiro a *Tuta absoluta*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 929-933, 2001.

GODA, H.; SHIMADA, Y.; ASAMI, T.; FUJIOKA, S.; YOSHIDA, S. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1319-1334, 2002.

GOFFREDA, J.C.; MUTSCHLER, M.A.; TINGEY, W.M. Feeding behavior of potato aphid affected by glandular trichomes of wild tomato. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Wezep, v. 48, p. 101-107, 1988.

GONÇALVES, L.D.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; GOMES, L.A.A.; NASCIMENTO, I.R. Herança de aciaçúcares em genótipos de tomateiro provenientes de cruzamento interespecífico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 699-705, 2007.

GONÇALVES, L.D.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; RESENDE, J.T.V.; CASTRO, E.M.; SANTOS, N.M.; NASCIMENTO, I.R.; FARIA, M.V. Relação entre zingibereno, tricomas foliares e repelência de tomateiros a *Tetranychus evansi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 267-273, 2006.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; CIOCIOLA, A.I.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; MALUF, W.R. Aspectos biológicos de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera:Gelechiidae) em dois genótipos de tomateiro contrastantes quanto ao teor de 2-tridecanona nos folíolos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, p. 247-251, 1999.

GROOT, S.P.C.; KARSSSEN, C.M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. **Planta**, Heidelberg, v. 171, p. 525-531, 1987.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 89, p. 2389-2393, 1992.

HAIJ, F.N.P. Histórico e situação atual da traça-do-tomateiro nos perímetros irrigados do submédio do São Francisco. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 1992, Águas de Lindóia. Jaguariúna: Embrapa, CNPDA, 1992. p. 57-59.

HE, Y.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D.F.; GAN, S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 876-884, 2002.

HOLTON, N.; CAÑO-DELGADO, A.; HARRISON, K.; MONTOYA, T.; CHORY, J.; BISHOP, G.J. Tomato *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1* is required for systemin-induced root elongation in *Solanum pimpinellifolium* but is not essential for wound signaling. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 1709-1717, 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Produção agrícola municipal 2002**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 ago. 2006.

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 333-342, 2002.

ISHIDA, T.; KURATA, T.; OKADA, K.; WADA, T. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 365-386, 2008.

KARNOWSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137A, 1965.

KAUFFMAN, W.C.; KENNEDY, G.G. Relationship between trichome density in tomato and parasitism of *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) eggs by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Environmental Entomology**, Washington, v. 18, p. 698-704, 1989.

KAZAMA, H.; DAN, H.; IMASEKI, H.; WASTENEYS, G.O. Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 1614-1623, 2004.

KERNAN, A.; THORNBURG, R.W. Auxin levels regulate the expression of a wound-inducible proteinase inhibitor. II. Chloramphenicol acetyl transferase gene fusion *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 73-78, 1989.

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**, Rockville, v. 122, p. 85-98, 2000.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 33-36, 2002.

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

LABORY, C.R.G.; SANTA-CECÍLIA, L.V.C.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; BEARZOTTI, E.; SOUZA, J.C. Seleção indireta para teor de 2-tridecanona e tomateiros segregantes e sua relação com a resistência à traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 733-740, 1999.

LANG, J.M.; EISINGER, W.R.; GREEN, P.B.; Effects of ethylene on the orientation of microtubules and cellulose microfibrils of pea epicotyls cells with polyamellate cell walls. **Protoplasma**, Wien, v. 110, p. 5-14, 1982.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas aos insetos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LEE, J.; PARTHIER, B.; LÖBLER, M. Jasmonate signaling can be uncoupled from abscisic acid signaling in barley: identification of jasmonate-regulated transcripts which are not induced by abscisic acid. **Planta**, Heidelberg, v. 199, p. 625-632, 1996.

LECKIE, C.P.; McAINSH, M.R.; ALLEN, G.J.; SANDERS, D.; HENTHERINGTON, A.M.; Absciscic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 22, p. 15837-15842, 1998.

LEITE, G.L.D.; PICANÇO, M.; AZEVEDO, A.A.; GONRING, A.H.R. Efeito de tricomas, aleloquímicos e nutrientes na resistência de *Lycopersicon hirsutum* à traça-do-tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 2059-2064, 1999.

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

LI, L.; LI, C.; LEE, G.I.; HOWE, G.A.; Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 99, p. 6416-6421, 2002.

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

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

LIN, S.Y.H.; TRUMBLE, J.T.; KAMAMOTO, J. Activity of volatile compounds in glandular trichomes of *Lycopersicon* species against two insect herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 14, p. 837-850, 1987.

LIVAK, K.L.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, Amsterdam, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOOS, R.A.; SILVA, D.J.H.; FONTES, P.C.R.; PICANÇO, M.C. Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 281-286, 2008.

LUCKWILL, L.C. **The genus *Lycopersicon***: historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberden: Aberden University Press, 1943, 44p.

MACKERNESS, S.A.H.; SURPLUS, S. L.; BLAKE, P.; JOHN, C.F.; BUCHANAN-WOLLASTON, V.; JORDAN, B.R. THOMAS, B. Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 22, p. 1413-1423, 1999.

MALO, E.A.; CASTREJÓN-GÓMEZ, V.R.; CRUZ-LÓPEZ, L.; ROJAS, J.C. Female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to conspecific sex pheromone and plant odors. **Annals of the Entomological Society of America**, Lexington, v. 97, p. 1273-1284, 2004.

MALUF, W.R.; CAMPOS, G.A.; CARDOSO, M.G. Relationships between trichome types and spider mite (*Tetranychus evansi*) repellence in tomatoes with respect to foliar zingiberene contents. **Euphytica**, Wageningen, v. 121, p. 73-80, 2001.

MARKOVIC-HOUSLEY, Z.; DEGANO, M.; LAMBA, D.; ROEPENACK-LAHAYE, E.; CLEMENS, S.; SUSANI, M.; FERREIRA, F.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 325, p. 123-133, 2003.

MEISSER, R.; YUVAL, J.; MELAMED, S.; SHAI, L.; SHALEV, G.; ASHRI, A., ELKIND, Y.; LEVY A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Maryland, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTOYA, T.; NOMURA, T.; FARRAR, K.; KANETA, T.; YOKOTA, T.; BISHOP, G.J. Cloning the tomato *Curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plant steroid hormone and peptide hormone signaling. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 3163-3176, 2002.

MOONS, A.; PRINSEN, E.; BAUW, G.; VAN MONTAGU, M. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 2243-2259, 1997.

MUIGAI, S.G.; SCHUSTER, D.J.; SNYDER, J.C.; SCOTT, J.W.; BASSETT, M.J.; MCAUSLANE, H.J. Mechanisms of resistance in *Lycopersicon* germplasm to the whitefly *Bemisia argentifolii*. **Phytoparasitica**, Jerusalem, v. 30, p. 347-360, 2002.

MÜSSIG, C.; BIESGEN, C.; LISSO, J.; UWER, U.; WEILER, E.W.; ALTMANN, T. The novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, p. 143-152, 2000.

NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; NITTA, T.; ASAMI, T.; FUJIOKA, S.; ARAI, Y.; SEKIMATA, K.; TAKATSUTO, S.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIDA, S. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 887-898, 2003.

- NOMBELA, G.; BEITIA, F.; MUÑIZ, M. Variation In tomato host response to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in relation to acyl sugar content and presence of the nematode and potato aphid resistance gene *Mi*. **Bulletin of Entomological Research**, New York, v. 90, p. 161-167, 2000.
- OBIADALLA-ALI, H.; FERNIE, A.R.; KOSSMANN, J.; LLOYD, J.R; Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 120, p. 196-204, 2004.
- O'DONNELL, P.J.; CALVERT, C.; ATZHORN, R.; WASTERACK, C.; LEYSER, H.M.O.; BOWLES, D.J. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, Kidlington, v. 274, p. 1914-1917, 1996.
- OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Heidelberg, v. 224, p. 133-144, 2006.
- PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, Kidlington, v. 253, p. 895-897, 1991.
- PENA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J. Absciscic acid mediates wound induction but not development-specific expression of the proteinase-inhibitor. II. Gene family. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 963-972, 1991.
- PENA-CORTÉS, H.; ALBRECHT, T.; PRAT, S.; WEILER, E.W.; WILLMITZER, L. Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. **Planta**, Heidelberg, v. 191, p. 123-128, 1993.
- PERAZZA, D.; VACHON, G.; HERZOG, M.; Gibberellins promote trichome formation by up-regulating GLABROUS1 in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 375-383, 1998.
- PIETERSEN, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 52-58, 1999.
- PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- POOLE, I.; WEYERS, J.D.B.; LAWSON, T.; RAVEN, J.A. Variations in stomatal density and index; Implications for paleoclimatic reconstructions, **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 705-712, 1996.

- RESENDE, J.V.T.; MALUF, W.R.; CARDOSO, M.G.; NELSON, D.L.; FARIA, M.V. Inheritance of acylsugar contents in tomatoes derived from an interspecific cross with the wild tomato *Lycopersicon pennellii* and their effect on spider mite repellence. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.1, p.106-116, 2002a.
- RESENDE, J.V.T.; MALUF, W.R.; FARIA, M.V.; PFANN, A.Z.; NASCIMENTO, I.R. Acylsugars in tomato leaflets confer resistance to the south American tomato pinworm, *Tuta absoluta* Meyr. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.63, p.20-25, 2006.
- RESENDE, J.T.V.; CARDOSO, M.G.; MALUF, W.R.; SANTOS, C.D.; GONÇALVES, L.D.; RESENDE, L.V.; NAVES, F.O. Método colorimétrico para quantificação de acilaçúcares em genótipos de tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1204-1208, 2002b.
- SAEIDI, Z.; MALLIK, B.; KULKARNI, R.S. Inheritance of glandular trichomes and two-spotted spider mite resistance in cross *Lycopersicon esculentum* "Nandi" and *L. pennellii* "LA2963". **Euphytica**, Wageningen, v. 154, p. 231-238, 2007.
- SAKIYAMA-SOGO, M.; SHIBAOKA, H. Gibberelin A₃ and abscisic acid cause the reorientation of cortical microtubules in epicotyls cells of the decapitated dwarf pea. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 34, p. 431-437, 1993.
- SCHWAN, R.; ROSE, A.H. Polygalaturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: Effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Stirling, v. 76, p. 62-67, 1994.
- SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom: a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.
- SELVANARAYANAN, V.; NARAYANASAMY, P.; Factors of resistance in tomato accessions against the fruit worm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Crop Protection**, Harbour Island, v. 25, p. 1075-1079, 2006.
- SEO, S.; SANO, H.; OHASHI, Y. Jasmonic acid in wound signal transduction pathways : Special section: hormones, regulating and signaling substances in plant growth and development. Part 2. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 101, p. 740-745, 1997.
- SGN: SOL GENOMICS NETWORK – UNIGENES. Disponível em: <http://www.sgn.cornell.edu/search/unigene.pl?unigene_id=SGN-U314320>. Acesso em: 10 out. 2008.
- SILVA, V.F. **Caracterização e avaliação de acilaçúcar sintético no comportamento de mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1886) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em tomateiro**. 2006. 69 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

SIMMONS, A.T.; GURR, G.M. Trichomes of *Lycopersicon* species and their hybrids effects on pests and natural enemies. **Agricultural and Forest Entomology**, London, v. 7, p. 265-276, 2005.

SIMMS, D.; CIZDZIEL, P.E.; CHOMCZYNSKI, P. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, London, v. 15, p. 99-102, 1993

SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Insecticide resistance in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, London, v. 2, p. 147-153, 2000.

SMALLE, J.; HAEGMAN, M.; KUREPA, J.; MONTAGU, M.V.; STRAETEN, D.V.D. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyls elongation in the light. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 94, p. 2756-2761, 1997.

SMITH II, J.L.; HARE, D. Spectral properties, gas exchange, and water potential of leaves of glandular and non-glandular trichome types in *Datura wrightii* (Solanaceae). **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 267-273, 2004.

STRASSNER, J.; SCHALLER, F.; FRICK, U.B.; HOWE, G.A.; WEILLER, E.W.; AMRHEIN, N.; MACHEROUX, P.; SCHALLER, A. Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 585-601, 2002.

SYMONS, G.M.; ROSS, J.J.; JAGER, C.E.; REID, J.B. Brassinosteroid transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 17-24, 2008.

THALER, J.S.; STOUT, M.J.; KARBAN, K.; DUFFEY, S.S. Exogenous jasmonates simulate insect wounding in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in the laboratory and field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.22, p.1767-1781, 1996.

TRAW M.B.; BERGELSON, J. Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellins on induction of trichomes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 1367-1375, 2003.

UEDA, J.; KATO, J. Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 246-249, 1980.

VICK, B.A.; ZIMMERMANN, D.C. Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 458-461, 1984.

WAGNER, G.J. Secreting glandular trichomes: More than just hairs. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 675-679, 2001.

WEIGEL, D.; GLAZE BROOK, J. **Arabidopsis**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, 1989. 370 p.

WENZEL, C.L.; WILLIAMSON, R.E. WASTENEYS, G.O.; Gibberellin-induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 813-822, 2000.

WEYERS, J.D.B.; JOHANSEN, L.G. Accurate estimation of stomatal aperture from silicone rubber impressions. **New Phytologist**, London, v. 101, p. 109-115, 1985.

WIKINSON, 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**, Kidlington, v. 270, p. 1807-1809, 1995.

YANO, K.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, N.; MAEDA, F.; TSUGANE, T.; SHIBATA, D. MiBASE: a database of a miniature tomato cultivar Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 23, p. 195-198, 2006.

YOUNG, R.J.; SCHEURING, C.F.; HARRIS-HALLER, L.; TAYLOR, B.H. An auxin-inducible proteinase inhibitor gene from tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 811-812, 1994.

ZALOM, F.G. Pests, endangered pesticides and processing tomatoes. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 613, p. 223-233, 2003.

ZARATE, S.I.; KEMPEMA, L.A.; WALLING, L.L. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 866-875, 2007.

ZIADI, S.; POUPARD, P.; BRISSET, M.N.; PAULIN, J.P.; SIMONEAU, P. Characterization in apple leaves of two subclasses of PR-10 transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 59, p. 33-43, 2001.

ZIEGLER, J.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; HAMBERG, M.; GRIMM, R.; GANAL, M.; WASTERNAK, C. Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 19132-19138, 2000.

ZHONG, H.; SIMONS, J.W. Direct comparison of GAPDH, β -actin, cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, München, v. 259, p. 523-526, 1999.

ZHU, C.; GAN, L.; SHEN, Z.; XIA, K. Interactions between jasmonates and ethylene in the regulation of root hair development in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 1299-1308, 2006.