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

**Convergência de vias de desenvolvimento: análise da capacidade de formar
órgãos *in vitro* em mutantes de tomateiro afetando a arquitetura foliar**

Guilherme Pereira de Oliveira

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

**Piracicaba
2015**

Guilherme Pereira de Oliveira
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

Convergência de vias de desenvolvimento: análise da capacidade de formar órgãos *in vitro* em mutantes de tomateiro afetando a arquitetura foliar

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
2015

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

Oliveira, Guilherme Pereira de

Convergência de vias de desenvolvimento: análise da capacidade de formar órgãos *in vitro* em mutantes de tomateiro afetando a arquitetura foliar / Guilherme Pereira de Oliveira. - - Piracicaba, 2015.

70 p. : il.

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

1. Micro-Tom 2. Regeneração 3. *In vitro* 4. *Ex vitro* 5. Arquitetura foliar 6. Organogênese
7. Hormônios I. Título

CDD 635.642
O46c

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

Aos meus pais Amador e Luiz (de coração)

Pelo apoio e exemplo de vida

A minha mãe, Rejane

Pela confiança e determinação

Ao meu irmão, Rogério

Pela amizade

Aos meus avós

Pelo exemplo de vida

Dedico

A minha amada amiga,

Cumplíce e namorada, Suzane

Pelo incentivo, compreensão e carinho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rejane e Luiz e meu irmão Rogério pelo convívio familiar, amizade e suporte ao longo da vida.

Aos meus familiares e amigos que me incentivaram e me apoiaram ao longo da minha jornada até aqui.

A Suzane, que sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos com muito carinho e compreensão. Te amo tanto! E, muito obrigado pela participação efetiva desde o início para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres pelas orientações, ensinamentos e confiança depositada em mim.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

À ESALQ pelo apoio acadêmico.

Aos professores do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ, Beatriz Appezzato, Daniel Scherer e Paulo de Castro pelo conhecimento e postura profissional transmitidos.

Ao Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka pela facilitação do uso da microscopia eletrônica de varredura neste trabalho.

A Solizete pela atenção para com assuntos administrativos.

A todos com os quais convivi ao longo de anos no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal. Devido a memória fraca, espero não ter esquecido de ninguém rs: Ivan, Lucas, Lilian, Agustin, Cássia, Alice, Fred, Mariana, Maísa, Ariadne, Marcela, João Pedro, Eloísa, Ana, Fernanda, Stevan (conhecido como Cabelo), Gabriel (vulgo Zorro), Jonata e Mateus. Aos agregados Geraldo e Juliana pela troca de ideias e experiências. Todos vocês ajudaram de alguma forma na minha formação e realização deste trabalho. Contudo, gostaria de ressaltar a ajuda dos amigos Fred, Cabelo, Mariana, Mateus e Cássia.

MUITO OBRIGADO!

“Saber é uma palavra cujo significado é muito amplo.
Prefiro dizer que estamos capacitados a fazer algumas suposições.”

Haldous Huxley

“O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existência.
Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da
eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade.
Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia.
Nunca perca a curiosidade...Não pare de se maravilhar.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Aspectos do processo de regeneração <i>in vitro</i>	17
2.2 Família KNOX e o mutante <i>Mouse-ears</i>	18
2.3 Família TCP e o mutante <i>La</i>	20
2.4 Família MYB e o mutante <i>potato-leaf</i>	21
2.5 Giberelina e o mutante <i>procera</i>	22
2.6 Auxina e o mutante <i>entire</i>	23
2.7 Tkn2/Let6 e o mutante <i>clausa</i>	24
2.8 Relação entre arquitetura foliar e regeneração <i>in vitro</i>	24
2.9 Micro-Tom com modelo genético e fisiológico	26
2.10 Objetivo	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Material Vegetal	29
3.2 Obtenção dos genótipos.....	29
3.3 Condições de cultivo	31
3.4 Caracterização fenotípica dos mutantes em arquitetura foliar.....	31
3.5 Desinfestação e germinação de sementes <i>in vitro</i>	32
3.6 Teste da capacidade de formação de raízes adventícias <i>in vitro</i>	32
3.7 Teste da capacidade de formação de gemas caulinares <i>in vitro</i>	32
3.8 Ensaio de crescimento de calos <i>in vitro</i>	33
3.9 Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares <i>ex vitro</i> e gemas caulinares <i>in vitro</i>	33
3.10 Correlação e Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Caracterização fenotípica dos mutantes em arquitetura foliar.....	35
4.2 Ensaio de capacidade de formação de raízes adventícias <i>in vitro</i>	41
4.3 Ensaio de capacidade de formação de gemas caulinares <i>in vitro</i>	41
4.4 Ensaio de crescimento de calos após repicagem em diferentes meios de cultura	43
4.5 Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares <i>ex vitro</i> e gemas caulinares <i>in vitro</i>	44
4.6 Análises de correlação	46
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÕES	61

REFERÊNCIAS..... 62

RESUMO

Convergência de vias de desenvolvimento: análise da capacidade de formar órgãos *in vitro* em mutantes de tomateiro afetando a arquitetura foliar

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, iniciado no começo do século XX, propiciou avanços no conhecimento científico e biotecnológico. O processo de regeneração *in vitro* depende tanto das condições de cultivo quanto da base genética dos explantes utilizados. Alguns autores postularam que a regeneração pode ser dividida em etapas e o balanço entre hormônios vegetais é responsável por determinar o destino dos explantes (e.g. formação de raízes, gemas ou calos). Em estudo realizado anteriormente, foi constatada a alta capacidade de regeneração de gemas caulinares adventícias *in vitro* do mutante *Mouse-ears*, que apresenta folhas com maior complexidade. Diante disso, neste trabalho outros mutantes que afetam a arquitetura foliar, como *entire*, *procera*, *clausa*, *potato-leaf* e *Mouse-ears*, foram avaliados *ex vitro* e *in vitro*, no “background” da cultivar Micro-Tom (MT).. A caracterização fenotípica dos genótipos demonstrou que as mutações estudadas afetam vários outros aspectos do desenvolvimento, além das folhas. Muitas das diferenças observadas *ex vitro*, são em parte devidas à transição de estágio vegetativo para reprodutivo. Ao analisarmos os resultados de regeneração *in vitro* (formação de gemas caulinares e raízes adventícias; e crescimento de calos), nota-se que a capacidade organogenética de cada mutante não tem correlação com o grau de complexidade foliar, mas sim com tipo de mutação envolvida. Análises morfológicas de eventos *in vitro* e *ex vitro* quanto à formação de gemas caulinares adventícias e do meristema apical caulinar, respectivamente, denotam que ocorrem tanto similaridades quanto disparidades entre os dois processos. Os resultados indicam que provavelmente os mutantes *entire* (resposta constitutiva a auxina por perda de função de um *AUX/IAA*) e *Mouse-ears* (super expressão do gene *KNOX TKN2*) atuam na etapa de indução de raízes e gemas, respectivamente, no processo de regeneração *in vitro*. Em contra partida, *procera* (resposta constitutiva a giberelina) atuaria na etapa de aquisição de competência ou retardo do desenvolvimento pós-indução. Além disso, *TKN2* demonstrou ter um importante papel na formação de gemas caulinares adventícias *in vitro*. As vias para a formação de órgãos *ex vitro* (e.g. folhas, raízes, gemas axilares etc.) são diferentes da *in vitro*. Apesar disso, vários genes e moléculas recrutados em uma via de desenvolvimento *ex vitro* podem interferir na organogênese *in vitro*.

Palavras-chave: Micro-Tom; Regeneração; *In vitro*; *Ex vitro*; Arquitetura foliar; Organogênese; Hormônios

ABSTRACT

Convergence of developmental pathways: *in vitro* analysis of organ formation capacity in tomato mutants affecting leaf architecture

The *in vitro* culture of plant cells, tissues and organs, started at the beginning of the 20th century, has been leading to scientific and biotechnological advances ever since. The process of *in vitro* regeneration depends on the growth conditions as well as the genotype of the explant. Several authors postulated that regeneration can be divided into steps and that the hormonal balance will determine the fate of the explant (e.g. formation of roots, shoots or callus). In a previous study, it was found that the mutant *Mouse-ears*, which exhibits a more complex leaf architecture, has high capacity of shoot regeneration. Hence, in the present work other mutants affecting leaf architecture such as *entire*, *procera*, *clausa*, *potato-leaf* and *Mouse-ears* were measured *ex vitro* and *in vitro* in the MT background. These assessments aimed to investigate if there are similarities in organogenesis between *in vitro* and *ex vitro*. The phenotypic characterization of the genotypes showed that these mutations affect several aspects of plant development and not only the leaf architecture. Many differences observed *ex vitro* are in part due to the transition from vegetative to reproductive phase. When analyzing the results of *in vitro* regeneration (formation of adventitious shoots and roots; and callus growing) it is noticed that the organogenetic capacity of each mutant has no correlation with the degree of leaf complexity but with the type of mutation involved. Morphological analysis of *in vitro* and *ex vitro* events, such as formation of adventitious shoots and shaping of shoot apical meristem, respectively, denotes similarities and divergences between the processes. The results indicate that probably the mutants *entire* (constitutive response to auxin due to a loss-of-function in an *AUX/IAA*) and *Mouse-ears* (overexpression of a *KNOX TKN2*) act at the induction step of root and shoot, respectively, in the *in vitro* regeneration process. On the other hand, *procera* (constitutive response to gibberellin) acts at the competence step or the arrest of the development after induction. Furthermore, *TKN2* showed an important role in the formation of *in vitro* adventitious shoots. The pathways for *ex vitro* organ formation (e.g. leaf, root, axillary buds, etc.) are different from that for *in vitro*. Nevertheless, genes and molecules recruited in the pathway of *ex vitro* development may interfere in the *in vitro* organogenesis.

Keywords: Micro-Tom; Regeneration; In vitro; Ex vitro; Leaf Architecture; Organogenesis; Hormones

1 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, iniciado no começo do século XX, propiciou avanços no conhecimento científico e biotecnológico desde então. Alguns desses avanços, como a descoberta da importância dos hormônios vegetais no controle da formação de um novo órgão (SKOOG e MILLER, 1957) e a obtenção de plantas transgênicas por intermédio do plasmídeo-Ti (MARTON et al., 1979), alavancaram os conhecimentos sobre fisiologia vegetal.

O processo de regeneração *in vitro* depende tanto das condições de cultivo quanto da base genética dos explantes utilizados. Segundo CHRISTIANSON e WARNICK (1988), o processo de regeneração é dividido em etapas e o balanço entre hormônios vegetais é responsável por determinar o destino (*e.g.* formação de raízes, gemas ou calos) dos explantes *in vitro*. Atualmente sabemos que esse processo é ditado pela interação de múltiplos fatores, como hormônios e genes, ditando organogênese *in vitro*.

Em estudo realizado anteriormente, foi constatada a alta capacidade de regeneração de gemas caulinares *in vitro* do mutante *Mouse-ears* (*Me*) (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012), que apresenta folhas mais complexas. Essa mutação deve-se a um fator de transcrição da família KNOXI, o gene *TKN2/LeT6*, que, no alelo mutado *TKn2*, tem expressão ectópica devido ao fusionamento deste ao promotor do gene para *frutose 6-fosfato fosfotransferase* (PARNIS et al., 1997). Além desse, o mutante *clausa* (AVIVI et al., 2000), que não foi caracterizado molecularmente, apresenta expressão ectópica de *TKN2*.

Outros genótipos com alterações na arquitetura foliar são devidos a vários tipos de mutações, entre elas, fatores de transcrição do tipo MYB e TCP, como visto nos mutantes *potato-leaf* (*c*) (BUSCH, et al., 2011) e *Lanceolate* (*La*) (ORI et al., 2007), respectivamente. Os mutantes *entire* (*e*) (ZHANG et al., 2007) e *procera* (*pro*) (JASINSKI et al., 2008) que tem mutações afetando a via de sinalização de auxina e giberelina, respectivamente, também conferem mudanças na capacidade organogenética das folhas.

É possível que genes recrutados para permitir às plantas uma plasticidade em seu desenvolvimento, tenham um importante papel na capacidade de regeneração *in vitro*. Nossa hipótese de trabalho é, portanto, a de que duas importantes vias de desenvolvimento, a organogênese foliar e a *in vitro*, possuem convergências, principalmente pelo fato de ambas dependerem da tomada de decisão entre permanecer meristemático ou se diferenciar, o que é afetado por alguns dos genes subjacentes às mutações supracitadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos do processo de regeneração *in vitro*

Os primeiros estudos envolvendo o cultivo *in vitro* de plantas foram iniciados no início do século XX e, desde então, vários avanços têm sido observados, sendo um dos principais, a descoberta da importância dos hormônios vegetais no controle da formação de um novo órgão (SKOOG e MILLER, 1957). Paralelamente, houveram avanços na aplicação prática desta técnica para obtenção de embriões somáticos a partir de calos (STEWART et al., 1958), obtenção de híbridos interespecíficos e intergenéricos, por meio de isolamento de protoplastos (COCKING, 1960) e utilização do plasmídeo-Ti na transformação genética de plantas (MARTON et al., 1979). Atualmente, a obtenção de plantas transgênicas, assim como a utilização do cultivo *in vitro*, têm sido muito importantes na investigação de mecanismos genéticos e moleculares que levam a uma maior capacidade organogênica (ATA et al., 2009; LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012).

O processo de regeneração *in vitro* depende de diversos fatores, como tipo de explante utilizado, suplementação de nutrientes, hormônios adicionados ao meio de cultivo, além de condições ambientais como temperatura e luminosidade. Christianson e Warnick (1988) descreveram o processo de regeneração propondo que o explante *in vitro* sofre uma dediferenciação (ou re-diferenciação) que o torna competente para que quando induzido, se determine e forme raízes ou gemas caulinares, seguindo balanços hormonais (SKOOG e MILLER, 1957). Hoje sabemos que esse processo, de modo simplificado, é afetado em vários níveis tanto pelos hormônios quanto por genes (Figura 1) que controlam a competência e a indução organogênica (LOMBARDI-CRESTANA et al. 2012).

Figura 1 - Hipótese de trabalho baseada nas fases de controle da regeneração *in vitro* proposto por (CHRISTIANSON e WARNICK, 1988) com contribuição de mutações que podem controlar alguns dessas fases. O mutante *procera* e o alelo *Rg1* afetam negativamente e positivamente a fase de aquisição de competência, refletindo na formação tanto de gemas caulinares quanto de raízes. O mutante *dgt* provavelmente afeta a fase de indução por ter baixa sensibilidade à auxina, alterando o balanço auxina/citocinina necessário para a indução de raízes. A mutação *Me*, acarretada por um gene KNOX, leva a um aumento de citocinina que pode ter um efeito indireto alterando o balanço auxina/citocinina, ou efeito direto na fase de indução de gemas caulinares. Retirado de LOMBARDI-CRESTANA et al., (2012)

Outro aspecto importante do processo de regeneração *in vitro* é a formação de calos tanto em meio indutor de gemas caulinares (SIM) quanto em meio indutor de raízes (RIM), devido provavelmente ao balanço auxina/citocinina, como demonstrado no trabalho de SKOOG e MILLER (1957). Tais calos podem dar origem a órgãos e/ou regenerar uma planta inteira, possibilitando o uso dessa técnica em processos biotecnológicos (GRESSHOF e DOY, 1972; KOORNNEEF et al., 1987). Em tomateiro, não há uma correlação direta entre a taxa de crescimento de calos e a capacidade de regeneração (KOORNNEEF et al., 1987; PERES et al., 2001; LIMA et al., 2009). Por outro lado, ao tentar regenerar órgãos a partir de calos, genótipos que têm uma alta capacidade de regeneração via outro tipo de explante, mantém uma maior taxa regenerativa também com calos (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012).

2.2 Família KNOX e o mutante *Mouse-ears*

A família gênica *KNOTTED 1-LIKE HOMEODOMAIN* (KNOX) foi descrita pela primeira vez no mutante *Knotted-1* (*Kn1*) de milho (HAKE et al., 1989; VOLLBRECHT et al., 1991).

Kerstetter et al. (1994) classificaram os membros da família *KN1* de acordo com sua homologia de sequência em duas classes: *CLASS 1 KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* e *CLASS 2 KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN* (Figura 2). Em *Arabidopsis*, a classe I é expressa principalmente no meristema apical caulinar, meristemas florais e caule, não sendo expressa em meristemas radiculares, folhas maduras e flores. A classe II pode ser diferencialmente expressa em todos os órgãos não havendo uma ação específica como a primeira classe.

Figura 2 - Filograma de Homeodomínio mostrando o alinhamento de proteínas BELL e KNOX de diferentes organismos, sendo (preto) *A. Thaliana*, (vermelho) arroz, (azul) gimnosperma, (turquesa) pteridófitas, (violeta) briófitas e (verde) algas verdes. Retirado de Hake et al. (2004)

A classe I é considerada um legítimo regulador meristemático por incitar a atividade meristemática fora do meristema apical quando esses genes são expressos ectopicamente (HAKE et al., 1995). A classe acima mencionada tem grande importância no estudo de mutações relacionadas à arquitetura foliar, já que, várias mutações relacionadas a genes *KNOX* remetem a alterações no desenvolvimento foliar. No caso de tomateiro, que tem folhas compostas, a expressão ectópica do gene *KN1* de milho, por intermédio do promotor constitutivo CaMV35S, leva a formação de folhas super-compostas (HAREVEN et al., 1996). Vários homólogos dessa classe são encontrados em diferentes espécies e tem papel importante

na regulação espaço-temporal do modo de crescimento e morfogênese juntamente com a ação de hormônios (HAKE et al., 2004; HAY et al., 2004).

Parnis et al. (1997) descrevem o mutante *Mouse-ears* (*Me*) de tomateiro tendo como características fenotípicas o retardamento do crescimento, folhas super compostas, atividade meristemática ectópica e perda de dominância apical. Essa mutação foi caracterizada pela expressão ectópica do gene *TOMATO KNOTTED-1 LIKE 2* (*TKn2* ou *Let6*), causada por sua fusão com o promotor do gene para *frutose 6-fosfato fosfotransferase*. Outra característica importante relatada por Parnis et al. (1997) é o efeito de dose de *Let6/TKn2* que em heterozigose confere um fenótipo mais semelhante ao tipo selvagem, enquanto o homozigoto apresenta várias anormalidades em diferentes órgãos.

2.3 Família TCP e o mutante *Lanceolate*

A família *TCP* de genes foi descrita pela primeira vez em 1999 e possui um domínio denominado TCP e um motivo de interação proteína-proteína do tipo basic *Helix-loop-Helix* (bHLH) (KOSUGI e OHASHI, 1997; CUBAS et al., 1999). Essa família é subdividida em classe I e II, de acordo com sua homologia de sequência e diferenças quanto a motivos de ligação com DNA ou outras proteínas (Figura 3). A classe II, além de diferir em motivos de ligação, possui um sítio de reconhecimento para o micro-RNA 319, o qual, regula negativamente os genes desta classe. Via de regra, a classe I é tida como promotora de crescimento e proliferação enquanto a classe II reprime o crescimento e proliferação (MARTÍN-TRILLO e CUBAS, 2009).

A mutação *Lanceolate* (*La*) que altera a arquitetura da folha de tomateiro foi descrita em 1962 (MATHAN e JENKINS, 1962), e tem como características folhas simples e pequenas, com folíolos alongados e margem lisa. Em homozigose, outros aspectos como fruto alongado, meristema apical caulinar com células grandes e em número reduzido estão presentes. Posteriormente se descobriu que esse gene codifica um fator de transcrição da família TCP, que é regulado pelo gene *MIR319*. O mutante *Lanceolate* possui uma base mutada na região de reconhecimento pelo miRNA319, alterando a escala temporal em que o seu mRNA é acumulado em relação ao tipo selvagem (ORI et al., 2007).

Figura 3 - Arvore filogenética de genes da família TCP mostrando relações entre proteínas de diferentes espécies de eudicotiledôneas *Arabidopsis thaliana* (At), monocotiledôneas *Oryza sativa* (Os) e membros representativos de *Antirrhinum majus* (Am), *Lotus japonicus* (Lj), *Solanum lycopersicum* (Sl), *Gerbera hybrida* (Gh), *Solanum tuberosum* (St), *Pisum sativum* (Ps) e *Zea mays* (Zm). Azul, verde e vermelho indicam os clados PCF, CYC/TB1 e CIN respectivamente. À direita a estrutura da proteína indica os motivos conservados: (azul) domínio TCP, (vermelho) domínio R e (azul) sítio alvo miR319. Retirado de Martín-Trillo e Cubas, (2009)

2.4 Família MYB e o mutante *potato-leaf*

A família gênica *MYB* foi descrita pela primeira vez em *Avian myeloblastosis virus* (AMV) e recebe seu nome devido ao primeiro organismo na qual foi descrita (KLEMPNAUER et al., 1982). O primeiro membro da família *MYB* clonado em plantas foi o gene *C1* de milho, que faz regulação da biossíntese do pigmento antocianina (PAZ-ARES et al., 1987). Essa família tem em comum o domínio *MYB* (R), que pode variar quanto ao número de repetições e são importantes na interação com proteínas e/ou ligação com DNA. Em plantas, essa família é dividida em três grandes grupos, MYB3R, R2R3-MYB e o último grupo que é o mais ramificado e pode variar de um a quatro domínios (R), os quais podem ter associado outros domínios (Figura 4). Em plantas superiores, o grupo R2R3-MYB é o mais

abundante, sendo que este e os outros grupos da família são envolvidos no controle do ciclo celular, relógio circadiano, biossíntese de metabólitos secundários e morfogênese (FELLER et al., 2011).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura de proteínas de plantas com domínio MYB e sequências conservadas de seus domínios de ligação com DNA. Domínios MYB são mostrados em verde e domínios conservados adicionais (domínio DUF3351 no homólogo CDC5 e o domínio DnaJ do homólogo MIDA/Zuotin) são mostrados em vermelho. Outro domínio mostrado é o P_C, que é encontrado na porção C-terminal da proteína ZmP1 (Grotewold *et al.*, 1994). Retirado de Feller et al. (2011)

O mutante *potato-leaf (c)*, que leva seu nome devido à aparência da sua folha com a de batata, foi muito utilizada em programas de melhoramento de tomateiro nos séculos XIX e XX. As principais características dessa mutação são diminuição na dissecação foliar e fusionalamento dos folíolos terminais. O gene envolvido com essa mutação é homólogo ao fator de transcrição MYB do tipo R2R3 *Blind (Bl)* encontrado em *A. thaliana* (MÜLLER et al., 2006). O alelo *c-1* tem a inserção do retrotransposon Rider/Kielia na região codificante do gene *BLIND2*, o alelo *c-2* tem uma deleção de 40.580 pares de base que remove o gene *C* e dois genes vizinhos exibindo assim o fenótipo de *potato-leaf* (BUSCH, et al. 2011).

2.5 Giberelina e o mutante *procera*

A cascata de sinalização por giberelina (GA) tem como um de seus componentes as proteínas do tipo DELLA, as quais interagem com o receptor solúvel de giberelina GA INSENSITIVE DWARF1 (GID1) (UEGUCHI-TANAKA et al. 2005). Quando GA está ligada a GID1, ocorre uma posterior ubiquitanação da proteína DELLA por intermédio do complexo protéico SCF^{SLY1}, o que leva a degradação da DELLA pelo complexo proteossômico 26S (HARBERD et al., 2009). A degradação da proteína DELLA permite que

ocorram as respostas mediadas por GA. A formação de órgãos está intimamente ligada à relação entre giberelina e citocinina (CK), sendo que em *A. thaliana*, GA inibe CK, mas o contrário não ocorre (GREENBOIM-WAINBERG et al., 2005). No caso do tomateiro, estudos demonstram que ocorre uma interação recíproca entre esses dois hormônios afetando processos de desenvolvimento (FLEISHON et al., 2011).

O mutante de tomateiro *procera* (*pro*) tem como fenótipo um maior crescimento do caule, folhas com poucos folíolos com segmentos maiores e bordas lisas, além de tender a produzir frutos partenocárpicos e com umbigo (JONES, 1987). A mutação se encontra no gene *Solanum lycopersicum* *GA INSENSITIVE* (*SIGAI*), que codifica uma proteína do tipo DELLA, que reprime genes induzidos por giberelina. O mutante *procera* possui a substituição de um aminoácido no motivo VHV(I/V)D, na posição 273, que é importante para a ação da proteína (JASINSKI et al., 2008). Como resultado, o mutante *procera* não reprime os genes relacionadas à giberelina em uma escala espaço-temporal adequada, tendo uma resposta do tipo constitutiva a esse hormônio (JASINSKI et al., 2008).

2.6 Auxina e o mutante *entire*

A auxina tem importante papel na sinalização de vários eventos relacionados ao desenvolvimento, como regulação da dominância apical (BOOKER et al., 2003), filotaxia (SMITH, 2008), formação de raízes laterais e adventícias (SWARUP et al., 2008). Uma via de sinalização bem descrita para este hormônio começa com a ligação da auxina ao receptor solúvel TIR1/AFB (DHARMASIRI et al., 2005; KEPINSKI et al., 2005) e uma proteína da família de repressores transcricionais AUX/IAA (TIWARI et al., 2001). Ao se ligar ao receptor, a auxina faz com que proteínas AUX/IAA se liguem ao complexo SCF^{TIR1/ABF} promovendo a sua ubiquitinação, o qual posteriormente será degradado pelo complexo proteossômico 26S, liberando os fatores de transcrição AUXIN RESPONSE FACTOR (ARFs). Ao serem liberados, os ARFs formam dímeros que promovem a transcrição de genes regulados por auxina (GRAY et al., 2001).

O mutante *entire* (*e*) possui, como características principais, folhas simples e frutos partenocárpicos. O gene *ENTIRE* pertence à família AUX/IAA, a qual está ligada as respostas à auxina, funcionando como reguladores da transcrição mediada por esse hormônio (ROUSE et al., 1998). Em tomateiro a repressão do gene *Aux/IAA9* leva ao aparecimento de plantas com folhas simples e frutos inférteis, assim como no mutante *entire* (WANG et al., 2005). Posteriormente, estudos demonstraram que a mutação *entire* se deve a deleção de uma base no

gene *Aux/IAA9*, que impede a formação da proteína integralmente, fazendo com que essa seja defectiva (ZHANG et al., 2007).

2.7 *TKN2/LeT6* e o mutante *clausa*

O mutante *clausa* (*clau*) tem um efeito pleiotrópico tanto na parte vegetativa quanto reprodutiva da planta. Nas folhas, causa um maior escurecimento e aparecimento de rugosidades na lâmina. Além disso, ocorre surgimento de meristemas ectópicos no fruto e fusão de órgãos. A mutação ainda não foi caracterizada quanto a sua identidade gênica e mecanismo de ação, mas confere uma expressão ectópica de *LeT6/TKN2* em folhas maduras na camada paliádica e região vascular (AVIVI et al., 2000).

2.8 Relação entre arquitetura foliar e regeneração *in vitro*

Em um estudo realizado em nosso laboratório, foi constatada a alta capacidade de regeneração de gemas caulinares *in vitro*, a partir de explantes cotiledonares do mutante *Mouse-ears* (*Me*). Por outro lado, o mutante *procera* com uma folha mais simples tem uma baixa capacidade de regeneração tanto de gemas quanto de raízes adventícias (LOMBARDI-CRESTANA et al. 2012) (Figura 5). As mutações em questão estão relacionadas a genes *KNOX*, no caso de *Me*, e *DELLA*, no caso de *pro*. As duas mutações agem de maneira oposta na complexidade foliar, aumentando e diminuindo, respectivamente. Curiosamente essa correlação também é vista *in vitro*, sendo que, entender como “peças” utilizadas em um programa de desenvolvimento podem afetar e/ou ser compartilhadas por outro é uma questão a ser desvendada nessa área.

Figura 5 - Regeneração de raízes e gemas caulinares *in vitro* a partir de explantes cotiledonares com oito dias de idade mostrando alta capacidade de regeneração de gemas caulinares em *Mouse-ears* (Me) e baixa capacidade de formar tanto gemas caulinares quanto raízes *procera* (pro). Retirado de Lombardi-Crestana et al. (2012)

A possível relação entre mutações que afetam a arquitetura foliar e a capacidade de regeneração *in vitro* em tomateiro ainda não foi explorada, apesar de seu potencial para o maior entendimento dessas duas vias de desenvolvimento. O conhecimento do papel dos genes que controlam as diferentes fases de regeneração permanece incerto, assim como muitas de suas relações com os hormônios auxina, citocinina e giberelina, discutidos anteriormente. Inferir como genes que alteram a arquitetura foliar agem sobre o processo de regeneração em conjunto com certos hormônios, pode ajudar a elucidar quais processos ditam a morfogênese *in vitro*. Outra pergunta embutida nesse trabalho é inferir se o processo de morfogênese *in vivo* das folhas, como proposto por Hay et al. (2004) (Figura 6), se relaciona de forma direta ou indireta com o *in vitro*.

Figura 6 - Regulação da atividade de hormônios por proteínas KNOX no meristema apical caulinar (SAM) de Arabidopsis. Representação de um corte longitudinal mostra que KNOX promove a síntese de citocinina (CK) que, por sua vez, promove a expressão de KNOX no SAM. Por outro lado, KNOX reprime giberelina (GA) e altas concentrações de auxina (IAA) podem reprimir KNOX. Gradiente de auxina no ponto de iniciação do primórdio foliar promove seu crescimento e diferenciação vascular. Retirado de Hay et al. (2004)

2.9 Micro-Tom com modelo genético e fisiológico

O avanço do conhecimento científico é embasado principalmente no uso de modelos genéticos, e o tomateiro, *Solanum lycopersicum*, apresenta-se como modelo viável para o entendimento de vários mecanismos da biologia vegetal, por permitir a integração de ferramentas e conceitos de genética, fisiologia vegetal e biologia molecular (MCCORMICK et al., 1986). A cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT) pode ser cultivada nas mesmas condições requeridas para o modelo *Arabidopsis thaliana* (EMMANUEL e LEVY, 2002), pois possui porte pequeno e produz frutos maduros em 70-90 dias (MEISSNER et al., 1997). Ante as vantagens da cultivar MT, esta foi adotada em nosso laboratório para estudos na área de desenvolvimento vegetal.

2.10 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de regeneração *in vitro* (organogênese) das mutações relacionadas à arquitetura foliar, assim como relacioná-la com processos morfogênicos *ex vitro* e o papel de certos hormônios e genes na regulação de ambos. Para tanto, visou-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

- 1 - Fazer uma caracterização fenotípica dos diferentes mutantes em arquitetura foliar.
- 2 - Testar a capacidade de regeneração *in vitro* quanto à formação de gemas caulinares e raízes adventícias dos diferentes genótipos que alteram a arquitetura foliar.

- 3 - Testar a capacidade de crescimento de calos *in vitro*.
- 4 - Relacionar processos morfogênicos *ex vitro* com *in vitro* e inferir se a arquitetura foliar afeta a capacidade de regeneração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Os genótipos utilizados para a realização desse trabalho encontram-se no *background* da cultivar MT, e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Genótipos no background MT utilizados na realização dos experimentos

Genótipo	Base genética	Função do gene	Acesso ¹
MT	homozigoto para o alelo <i>sp,d</i>	Fator de transcrição do tipo CETS ; Família Citocromo P450	LA3911 (cv Micro-Tom)
MT- <i>e</i>	homozigoto para o alelo <i>e</i>	Fator de transcrição do tipo AUX/IAA	LA2922
MT- <i>pro</i>	homozigoto para o alelo <i>pro</i>	Fator de transcrição do tipo DELLA	LA0565 (cv Condine Red)
MT- <i>Me/+</i>	heterozigoto para o alelo <i>Me</i>	Fator de transcrição do tipo Homeobox	LA0715
MT- <i>clau</i>	homozigoto para o alelo <i>clau</i>	–	LA3583
MT- <i>c</i>	homozigoto para o alelo <i>c</i>	Fator de transcrição do tipo MyB	LA3211

¹ Os números de acesso para identificação no banco de dados do Tomato Genetics Resource Center (TGRC), da origem genética da mutação introgridida. Mais informações sobre os mutantes podem ser adquiridas pelo endereço: <http://tgrc.ucdavis.edu/> e <http://www.esalq.usp.br/tomato>.

3.2 Obtenção dos genótipos

A introgressão de mutações ou variações alélicas naturais na cultivar MT decorre de vários cruzamentos e retrocruzamentos (CARVALHO et al., 2011) (Figura 7). Nesse processo, pólen retirado das plantas mutantes é utilizado para polinizar flores emasculadas de MT. O primeiro cruzamento entre MT e os mutantes produz F1. O próximo passo é deixar que as plantas dessa geração autofecundem para a obtenção de F2 onde ocorre a primeira seleção para porte pequeno e a presença da mutação. Após essa etapa, retrocruzamentos com MT são feitos até a sexta geração (BC6), permitindo que haja autofecundação a cada duas gerações para a visualização das mutações recessivas em homozigose. Obtida a geração BC6F2, essa é considerada uma isolinha de MT (REID,1993).

Com excessão do genótipo *clau* que foi introgridido ao longo deste trabalho, todos os outros genótipos utilizados já haviam sido previamente introgrididos na cv MT. O mutante *Me*, já introgridido, foi cruzado com MT gerando sementes heterizogotas para *Me* que foram utilizadas nos experimentos. Uma descrição mais detalhada de todos os mutantes utilizados no trabalho pode ser vista no site do laboratório (www.esalq.usp.br/tomato).

Figura 7 – Esquema do processo de introgressão do mutante *notabilis* a cultivar MT. Após a geração BC6F2 essa é considerada quase isogênica a MT. Retirado de Carvalho et al. (2011).

3.3 Condições de cultivo

As plantas utilizadas nos experimentos foram cultivadas na casa de vegetação (CV) do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, no Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ-USP, a qual possui sistema de irrigação automático (4 vezes ao dia), temperatura média anual de 28°C, fotoperíodo de 11h/13h (inverno/verão), e radiação de 250-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A germinação das sementes foi realizada em vasos plásticos de 350 mL contendo o substrato de semeadura, o qual consiste de uma mistura do substrato comercial Basaplant® (Base Agro, Artur Nogueira, SP, Brasil) e vermiculita expandida na proporção de 1:1, adubado com 1g da formulação NPK 10:10:10 e 4g de calcário por litro. A instalação dos experimentos se deu com o transplântio das plântulas 10 dias após a semeadura em vasos de plástico de 250 mL, utilizando uma mistura de substrato com vermiculita, também na proporção de 1:1, porém adubado com 8g da formulação NPK 10:10:10 e 4g de calcário por litro. Após a instalação dos experimentos, e posterior pegamento das plântulas, foi realizada uma adubação foliar aos 30 dias após a semeadura (DAS) com fertilizante comercial Peter professional® 20-20-20 (The Scotts Company, Marysville, OH, Estados Unidos da América) na concentração de 2g por litro. Além de uma adubação de cobertura na concentração de 1,0g da formulação NPK 10:10:10 por planta aos 40 DAS.

3.4 Caracterização fenotípica dos mutantes em arquitetura foliar

As plantas dos diferentes genótipos foram cultivadas em vasos de 250 mL, conforme o item 3.3, até os 65 DAS. Em seguida, elas foram avaliadas quanto as diferentes características fenotípicas. A altura total das plantas foi realizada com o auxílio de uma régua, sendo tomada a medida a partir da cicatriz cotiledonar até a parte mais alta da mesma. O peso fresco do caule foi medido com o auxílio de uma balança de precisão (BEL engineering) a partir da cicatriz cotiledonar, sendo que, as folhas verdadeiras do eixo principal até o ápice caulinar já haviam sido retiradas. O comprimento do 1º, 2º e 3º entrenó foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Western PRO). O número de folhas até a determinação foi refeito de forma manual. Fotos dos mutantes foram feitas com o auxílio de uma camera. A porcentagem de gemas axilares com relação ao tamanho da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª folha, foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (Western PRO). O peso fresco da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª folha foi medido com o auxílio de uma balança de precisão (BEL engineering). O escaneamento da quinta folha de cada planta foi realizado com o auxílio de uma impressora multifuncional

(Laser Jet Pro CM1415fnw color MFP) e, a partir dessas imagens foi montada a prancha com os diferentes mutantes. Esses mesmos dados foram utilizados para a mensuração da área e perímetro foliar com a ajuda do ImageJ/Fiji v.1.47 software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.5 Desinfestação e germinação de sementes *in vitro*

Para a germinação, as sementes foram desinfestadas com uma solução contendo hipoclorito de sódio (30 % da solução comercial) e duas gotas de detergente, em cada 200 mL, durante 15 minutos sob agitação. A seguir, as sementes foram enxaguadas com água estéril por três vezes em capela de fluxo laminar.

As sementes foram inoculadas em frascos contendo meio de cultura para germinação composto por metade da concentração dos sais básicos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), metade da concentração de vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), 15 g/L sacarose e 2,3 g/L de phytagel. Os frascos contendo as sementes permaneceram por quatro dias no escuro e depois foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1 °C, por mais quatro dias.

3.6 Teste da capacidade de formação de raízes adventícias *in vitro*

Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade (após a semeadura *in vitro*) conforme descrito no item 3.5, e inseridos em placas de Petri contendo Meio Basal – MB (MS acrescido de vitaminas B5, 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar, pH = 5,8) suplementado com 0,4 µM de ácido naftaleno acético (ANA), resultando no meio RIM (Root Inducer Medium). Foram inoculados 15 explantes cotiledonares por placa (repetição), totalizando seis repetições por tratamento (genótipo), cada placa contendo 30 mL do meio. Os explantes foram mantidos por 10 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1 °C. Após o período do experimento foi avaliado a porcentagem de explantes com raízes, o número de raízes por explante e o aspecto visual das placas foi capturado com auxílio de uma camera digital (Samsung MX1000 CEO06780).

3.7 Teste da capacidade de formação de gemas caulinares *in vitro*

Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade (após a semeadura *in vitro*) conforme descrito no item 3.5, e inseridos em placas de Petri contendo

MB suplementado com 5 μ M de benzilaminopurina (BAP), resultando no meio SIM (Shoot Inducing Medium). Foram inoculados 15 explantes cotiledonares por placa (repetição), totalizando seis repetições por tratamento (genótipo), cada placa contendo 30 mL do meio. Os explantes foram mantidos por 21 dias em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$. Após o período do experimento foi avaliado a porcentagem de explantes com gemas caulinares, o número de gemas por explante e o aspecto visual das placas foi capturado com auxílio de uma camera digital (Samsung MX1000 CEO06780).

3.8 Ensaio de crescimento de calos *in vitro*

Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade (após a semeadura *in vitro*) conforme descrito no item 3.5, e inseridos em placas de Petri contendo MB suplementado com 0,5 μ M de benzilaminopurina (BAP) e 1,0 μ M de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D), resultando no meio CIM (Callus Inducing Medium). Após 21 dias de indução em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, os calos foram repicados em capela de fluxo laminar e colocados em placas de Petri contendo meio CIM ou SIM, onde permaneceram por mais 28 dias em sala de crescimento sobre as mesmas condições descritas acima. Foram inoculados nove calos por placa (repetição), totalizando seis repetições por tratamento (genótipo), cada placa contendo 30 mL do meio. Após o período do experimento esses foram avaliados quanto ao peso fresco total de calos por placa com auxílio de uma balança de precisão (TECNAL Classe I). O aspecto visual das placas foi capturado com auxílio de uma camera digital (Samsung MX1000 CEO06780).

3.9 Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares *ex vitro* e gemas caulinares *in vitro*

Ápices meristemáticos de plantas crescidas em casa de vegetação sobre as mesmas condições do item x foram isolados 15 DAS, assim como gemas caulinares de explantes cotiledonares crescidos em SIM por 21 dias sobre as mesmas condições do item 3.7. Após o isolamento, o material vegetal foi fixado em solução de Karnovsky modificado por pelo menos 3 dias. Em seguida foi realizada uma pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1%, seguida da desidratação por acetona em série crescente de concentração e a secagem ao ponto crítico com o auxílio do aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers CPO 050) . Ao final desse processo os materiais foram montados nos “*stubs*” e levados para a metalização no metalizador (Balzers MED 010). A captura das imagens foi realizada com o microscópio

eletrônico de varredura (LEO 435 VP). Mais informações sobre os procedimentos utilizados podem ser encontradas na 2ª edição do Curso Introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura (TANAKA e KITAJIMA, 2009).

3.10 Correlação e Análise Estatística

As análises de correlação foram feitas com ajuda do programa Microsoft®Excel®2013 sendo os parâmetros de folha correlacionados com os ensaios in vitro. Dessa forma, o peso fresco da terceira folha foi correlacionado com a porcentagem de explantes com gemas caulinares em SIM, porcentagem de explantes com raízes adventícias e peso fresco dos calos. Da mesma forma, a análise foi feita para a área e perímetro da quinta folha. Todos os dados utilizados para a realização das correlações provem das médias de cada genótipo nos experimentos realizados anteriormente.

Todos os experimentos citados acima foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os dados das variáveis foram submetidos as análises de variância com auxílio do programa Microsoft®Excel®2013 (disponível em: www.microsoft.com) e as médias comparadas pelo teste de Duncan.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica dos mutantes em arquitetura foliar

A análise da quinta folha dos diferentes mutantes em arquitetura foliar evidencia uma forte influência dos genes em questão com a dissecação foliar (Figura 8). Podemos observar que existem folhas com menor grau de complexidade, apresentando configuração simples, como é caso de *La* e *e*. Folhas com folíolos primários fundidos e lobação diferente, como no caso de *c* e *sf*. Os mutantes *pro* e *clau*, apesar de apresentarem padrão normal de número de folíolos primários para o background MT, apresentaram um diferente padrão de serração marginal. Além disso, folhas com alta complexidade foliar exibem padrão de lobação e serração marginal diferentes, além de apresentarem folíolos intercalares, como no caso de *Pts* e, folíolos secundários e terciários como no caso de *Me* (Figura 8).

Figura 8 - Folha dos diferentes mutantes que afetam arquitetura foliar no background Micro-Tom. Podemos notar um aumento gradativo de complexidade desde a folha mais simples, *La*, até a mais elaborada, *Me*. A quinta folha de cada planta é representada na imagem. Avaliação realizada 65 dias após a semeadura. Barra de escala = 1 cm

A altura média das plantas também é outro aspecto influenciado pelos genes estudados, sendo que, os mutantes *pro* e *e* apresentaram as maiores médias da avaliação, 24,9 e 22,1 cm, respectivamente, assim como *Me* e *clau* as menores, 12,6 e 11,1 cm,

respectivamente (Figura 9A). O peso fresco da parte aérea também varia de acordo com o tipo de mutação envolvida, sendo que plantas de *Me* e *clau* apresentaram valores significativamente menores que os demais genótipos avaliados para essa variável (Figura 9B).

Figura 9 – Caracterização fenotípica dos diferentes mutantes em aquitetura foliar. A. Altura média das plantas. Note que plantas com folhas mais elaboradas tem menor altura. B. Peso fresco da parte aérea. Observe que as plantas de *Me* e *clau* tem menor peso fresco. Avaliação realizada 65 dias após a semeadura. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão (n = 8 repetições). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P < 0,05$

O comprimento dos entrenós também é afetado pelos genótipos estudados. O primeiro entrenó não apresentou diferenças significantes entre os genótipos (Figura 10A). O segundo entrenó apresentou uma diferença significativa entre *pro*, 12 mm, e as demais plantas que tiveram média próxima a MT, 5,3 mm (Figura 10B). No terceiro entrenó *pro* continuou apresentando o maior comprimento, 10,4 mm, enquanto os outros genótipos exibiram pequenas variações com destaque para *clau* com média de 3 mm (Figura 10C).

Figura 10 - Caracterização fenotípica das plantas dos diferentes mutantes em arquitetura foliar. A. Comprimento do 1º entrenó. B. Comprimento do 2º entrenó. C. Comprimento do 3º entrenó. Podemos notar que *pro* apresentou as maiores médias de comprimento dos entrenós. Avaliação realizada 65 dias após a semeadura. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão (n = 8 repetições). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P < 0,05$

O número de folhas até a determinação das plantas variou muito entre os genótipos. Os genótipos *pro* e *e* exibiram um atraso na transição de meristema vegetativo para o reprodutivo, emitindo, em média, 8,87 e 8 folhas, respectivamente, antes da determinações. Os mutantes *Me* e *clau* apresentaram menos folhas, 5,5 e 4, respectivamente, diferindo dos demais genótipos (Figura 11A). Um efeito visível da diferença do número de folhas até a determinação das plantas pode ser notado no tamanho das plantas de *clau*, que apresentam menor porte quando comparadas a MT. Outra característica notável é o vigor da ramificação lateral das primeiras folhas verdadeiras em *clau*, o que não é observado em MT (Figura 11B).

Figura 11 - Caracterização fenotípica das plantas dos diferentes mutantes em aquitetura foliar. A. Número de folhas até a primeira inflorescência. Note que *pro* e *e* tem mais folhas até a determinação, enquanto *Me* e *clau* exibem menos. B. Aspecto visual de MT e *clau*. Podemos notar que o número de folhas até a determinação tem efeito no tamanho das plantas. Avaliação realizada 65 dias após a semeadura. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão (n = 8 repetições). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P < 0,05$. Barra de escala = 5 cm

O crescimento e/ou desenvolvimento das gemas axilares nas folhas verdadeiras segue padrões distintos entre os genótipos. Na primeira folha, *e* quase não apresenta gemas visíveis e em *pro* nenhuma é vista. Os mutantes MT e *Me* possuem aproximadamente 60% das plantas avaliadas com estruturas visíveis, diferindo apenas na proporção de tamanho entre si (Figura 12A). Na segunda folha nenhuma gema foi detectada em *e* e *pro*. Os genótipos *Me* e *c* apresentaram 75% das plantas com gemas visíveis e, *clau* com 87%, destacou-se pela presença de estruturas com mais de 1cm (Figura 12B). Na terceira folha *pro* não apresentou nenhuma gema visível. Os mutantes *Me* e *clau* apresentaram 100% das plantas avaliadas com estruturas visíveis, sendo que em *clau* todas elas tinham mais de 1cm de comprimento (Figura 12C).

Na quarta folha *pro* continuou a não apresentar gemas detectáveis. As plantas de *clau* mantiveram 100 % das gemas com mais de 1 cm, enquanto MT e *c* aumentaram também a proporção de gemas com as mesmas características de *clausa* (Figura 12D).

Figura 12 - Caracterização fenotípica das plantas dos diferentes mutantes em arquitetura foliar. A. Porcentagem de gemas axilares na primeira folha com relação ao seu tamanho. B. Porcentagem de gemas axilares na segunda folha com relação ao seu tamanho. C. Porcentagem de gemas axilares na terceira folha com relação ao seu tamanho. D. Porcentagem de gemas axilares na quarta folha com relação ao seu tamanho. Podemos observar que *pro* não tem gemas axilares desenvolvidas enquanto *clau* exibe fenótipo oposto. As gemas foram classificadas em não detectável (barra cinza clara), até 1 cm (barra cinza) e acima de 1 cm (barra cinza escuro). Avaliação realizada 65 dias após a semeadura

A dissecação foliar tem influência direta em parâmetros usados para medir seu grau de complexidade. O peso fresco da folha varia de acordo com o genótipo estudado e o grau de desenvolvimento e expansão das mesmas, porém a primeira e a segunda folha de todos os mutantes não tiveram variações significativas. Na terceira folha observasse que *Me* tem uma

média de peso três vezes maior que o restante das folhas. Na quarta folha foi mantido o mesmo padrão encontrado na terceira folha, mas uma observação interessante é que todos os genótipos avaliados apresentaram um progressivo aumento de peso, com exceção de *Me* que exibiu uma redução (Figura 13A). A área foliar fornece um bom parâmetro para avaliação da complexidade foliar. O mutante *Me* possui a maior área, sendo essa duas vezes maior que MT, 102,9 e 43,6 cm², respectivamente. Por outro lado, as plantas de *e* apresentaram a menor área foliar, 15,8 cm² diferenciando-se das demais (Figura 13B). O perímetro foliar fornece uma dimensão da complexidade em relação a número de folíolos, lobação e serração marginal das folhas. O perímetro de *Me* é em média cinco vezes maior que o de MT, 443,6 e 82,3 cm, respectivamente. O mutante *e* apresentou o menor perímetro foliar, 24,4 cm, diferindo de *clau*, *Me* e MT (Figura 13C).

Figura 13 - Caracterização fenotípica das plantas dos diferentes mutantes em arquitetura foliar. A. Peso fresco da primeira, segunda, terceira e quarta folha. Note que *Me* se destaca em todas as folhas avaliadas chegando ao auge do seu peso na terceira folha. B. Área foliar. C. Perímetro foliar. Observe que para ambas as variáveis, área e perímetro foliar, *e* e *Me* apresentam as menores e maiores médias respectivamente. Avaliação realizada 65 dias após a semeadura. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão (n = 8 repetições para peso; n = 5 repetições para área e perímetro). Asterisco indica que não foi feita avaliação. Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, P>0,05

4.2 Ensaio de capacidade de formação de raízes adventícias *in vitro*

A capacidade de gerar raízes adventícias *in vitro* varia de acordo com o genótipo. No ensaio de porcentagem de explantes cotiledonares com raízes, os mutantes *c* e *pro* apresentaram as menores taxas de regeneração, 73 e 48% respectivamente (Figura 14A). O número de raízes por explante cotiledonar é uma forma de refinar o teste de capacidade organogênica de cada genótipo. O mutante *e* foi o que apresentou a maior média, 9 raízes. Por outro lado, explantes de *c* e *pro* são os que tiveram a menor taxa de regeneração com 2,5 e 1, respectivamente (Figura 14B). O aspecto visual dos explantes cotiledonares com raízes varia de acordo com cada mutação. As raízes de MT e *e* apresentaram uma maior densidade de pelos radiculares que *pro*. Além disso, o diâmetro e comprimento médio das raízes desse último mutante parecem ser maiores e menores, respectivamente (Figura 14C).

Figura 14 - Ensaio de capacidade de formação de raízes adventícias *in vitro* dos diferentes mutantes em arquitetura foliar utilizando explantes cotiledonares. A. Porcentagem de explantes com raízes. Observe que *pro* tem a menor taxa de regeneração. B. Número de raízes por explante. Note que *Me* apesar de ter uma porcentagem de regeneração equivalente a MT e *e* apresenta menos raízes por explante que ambos. C. Placas de Petri representando MT, *e* e *pro*. Podemos observar que *pro* apresenta raízes menores e com menos pelos radiculares. Avaliação realizada 10 dias após a inoculação dos explantes em meio RIM. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão ($n = 6$ placas de Petri contendo 15 explantes cotiledonares). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P > 0,05$. Placa de Petri = 90 mm de diâmetro. Barra de escala = 1 cm

4.3 Ensaio de capacidade de formação de gemas caulinares *in vitro*

O teste de capacidade de regeneração de gemas caulinares *in vitro* mostra uma clara diferença na capacidade de regeneração. A maior porcentagem de explantes cotiledonares com gemas foi observada em *Me* com 97%. Por outro lado, o genótipo *pro* apresentou a menor capacidade de regeneração com 30% em média (Figura 15A). A contagem de gemas caulinares por explante apesar de não ser tão contrastante e precisa, pode dar um indício da importância de certos genes na capacidade organogenética. O mutante *Me* apresentou o maior número de gemas por explante, 3,0 em média. Já o restante dos genótipos avaliados não apresentou diferença expressiva entre si, apesar de *pro* ter uma média de 0,6 gemas (Figura 15B). O aspecto visual dos explantes cotiledonares com gemas caulinares *in vitro* varia em quantidade de gemas observáveis e em morfologia dos órgãos formados. O mutante *Me* é o que apresenta o maior número de gemas caulinares por explante, além disso, a morfologia das gemas e também de folhas formadas é mais parecida com o encontrado *ex vitro* (Figura 15C).

Figura 15 - Ensaio de capacidade de formação de gemas caulinares *in vitro* dos diferentes mutantes em arquitetura foliar utilizando explantes cotiledonares. A. Porcentagem de explantes com gemas. Observe que *Me* apresenta a maior capacidade de formação de gemas, enquanto *pro* a menor. B. Número de gemas por explante. Note que *Me* apresenta a maior quantidade de gemas por explante e apesar de *pro* ter a menor taxa de regeneração ele não diferiu dos demais genótipos nessa variável. C. Placas de Petri representando MT, *Me* e *pro*. Pode-se observar que as estruturas formadas em *Me* são as mais parecidas com as *ex vitro*. Avaliação realizada 21 dias após a inoculação dos explantes em meio SIM. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão (n = 6 placas de Petri contendo 15 explantes cotiledonares). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P > 0,05$. Placa de Petri = 90 mm de diâmetro. Barra de escala = 1 cm

4.4 Ensaio de crescimento de calos após repicagem em diferentes meios de cultura

O crescimento de calos *in vitro* é afetado tanto pelo genótipo avaliado quanto pelo tipo de meio de cultura no qual ele cresce. O calos crescidos em meio CIM tiveram um peso final médio de 1,16g, sendo que, dentre os genótipos avaliados, *e* diferenciou-se significativamente com um maior peso (Figura 16A). O aspecto visual dos calos de MT e *e* não diferem tanto quanto a tamanho e forma (Figura 16B,C).

Os calos crescidos em meio SIM sobre as mesmas condições dos calos citados acima, tiveram um peso final médio maior que o primeiro, 2,15 g em média. Dois genótipos tiveram resultados interessantes quanto ao crescimento dos calos nesse experimento, *pro* e *clau*

apresentaram um peso três e 1,3 vezes maior, respectivamente, quando comparados com o experimento em CIM (Figura 16D). O aspecto visual dos calos de MT e *pro* diferiram quanto a tamanho e provavelmente diferenciação celular, pois *pro* tem calos maiores e com pontos esverdeados, quando comparado com o primeiro (Figura 16E,F).

Figura 16 - Ensaio de crescimento de calos após repicagem em diferentes meios de cultura. A. Peso fresco dos calos em meio CIM. B,C. Placas de Petri de MT e *e* representando calos em CIM. Note que em CIM os calos quase não variaram seu peso. D. Peso fresco dos calos em meio SIM. E,F. Placas de Petri de MT e *pro* representando calos em SIM. Note que em SIM todos os genótipos tiveram um peso maior quando comparados ao caso acima, com *pro* se destacando. Após 21 dias de indução dos calos em meio CIM, os mesmos foram repicados e colocados em meio CIM e SIM onde permaneceram por 28 dias até a avaliação. Dados apresentados referem-se a média de cada genótipo. Barras representam erro padrão ($n = 6$ placas de Petri contendo 9 calos). Letras minúsculas nas barras indicam diferenças estatísticas de acordo com teste de Duncan, $P > 0,05$. Placa de Petri = 90 mm de diâmetro. Barra de escala = 1 cm

4.5 Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares *ex vitro* e gemas caulinares *in vitro*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que existem diferenças morfológicas tanto *ex vitro* quanto *in vitro* (Figura 17 e 18). Quando comparamos os materiais *ex vitro* entre si, podemos notar uma clara diferença no estado de desenvolvimento das folhas e meristemas apicais. As folhas de *pro* são as mais expandidas, porém, com menor grau de dissecação quando comparadas a MT e *clau*. Seguindo essa mesma linha, o meristema apical caulinar de *pro* encontra-se em estado vegetativo, pelas imagens, enquanto os outros dois (MT e *clau*) já se encontram em estado reprodutivo com os verticilos florais em desenvolvimento (Figura 17), corroborando com os dados de número de folhas até a determinação das plantas (ver Figura 11).

Os materiais observados em MEV cultivados *in vitro* também diferiram entre si. As amostras de *clau* quase não apresentavam folhas e *pro* apresentava estruturas distorcidas que lembram folhas. Os meristemas reprodutivos de *clau* já se encontravam em estágio mais avançado de desenvolvimento e, os de *pro* não tinham uma morfologia muito clara, o que impossibilitava definir o estágio de desenvolvimento dos meristemas (Figura 17).

Os meristemas de *pro*, *in vitro*, foram os que mais contrastaram morfologicamente do ápices cultivados em CV. Apesar das gemas de *clau* mostraram-se diferentes quanto a frequência de folhas *in vitro*, o tempo de transição de estágio vegetativo para reprodutivo parece seguir a mesma tendência (mais rápido) em ambas as condições. Parte dos tricomas tectores da parte abaxial das folhas são maiores *ex vitro* em boa parte dos casos (Figura 17).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares *ex vitro* e gemas caulinares *in vitro* de MT, *pro* e *clau*. Note que *ex vitro pro* tem o menor grau de dissecação foliar, assim como seu meristema ainda se encontra em estado vegetativo pelas imagens. Observe também que os meristemas de *pro in vitro* apresentam morfologia atípica e, *clau* em mesma condição, tem vários meristemas reprodutivos. Ápices caulinares foram preparados 15 dias após a semeadura e gemas caulinares 21 dias após inoculação dos explantes cotiledonares em meio SIM. Barras de escala = 100 μ m

Ex vitro, as folhas de *e* são as mais alongadas, porém, com menor grau de dissecação quando comparadas a *c* e *Me* que tem maior grau de complexidade. Seguindo essa mesma

linha, o meristema apical caulinar de *e* encontra-se em estado vegetativo, de acordo com imagens analisadas, enquanto os de *Me* e *c* já se encontram em estágio reprodutivo (Figura 18).

Os materiais observados em MEV cultivados *in vitro* também diferiram entre si. As amostras de *c* quase não apresentavam folhas enquanto *e* tinha folhas com pouca dissecação ao compararmos com *Me*. Os meristemas reprodutivos de *clau* e *Me* já se encontravam em um estágio mais avançado de desenvolvimento enquanto *e* ainda se encontrava em um estágio inicial de transição (Figura 18).

O mutante *Me* foi o que apresentou uma morfologia mais parecida com o material *ex vitro*. Os meristemas de *c* contrastaram morfológicamente do ápices cultivados em CV devido as poucas folhas formadas *in vitro*. As gemas de *e* foram semelhantes em relação ao tempo de transição (mais lento) de estágio vegetativo para reprodutivo. Novamente, parte dos tricomas tectores da parte abaxial das folhas são mais maiores *ex vitro* em boa parte dos casos, sendo essa diferença bem acentuada em *entire* (Figura 18).

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de ápices caulinares *ex vitro* e gemas caulinares *in vitro* de *e*, *Me* e *c*. Note que *ex vitro* os primórdios foliares de *Me* apresentam o maior grau de dissecação foliar enquanto *e* o menor. Já *in vitro*, observe que os primórdios foliares de *Me* também apresentam maior complexidade e *c* tem vários meristemas reprodutivos. Ápices caulinares foram preparados 15 dias após a semeadura e gemas caulinares 21 dias após inoculação dos explantes cotiledonares em meio SIM. Barras de escala = 100 µm

4.6 Análises de correlação

As análises de correlação entre regeneração *in vitro* e parâmetros de complexidade foliar demonstraram sinergia em alguns casos. A capacidade de regeneração de gemas caulinares quando defrontada com peso fresco da folha, área e perímetro foliar, apresenta um R^2 de 0,56, 0,50 e 0,44, respectivamente, demonstrando uma correlação entre surgimento de gemas e grau de dissecação foliar. A capacidade de formação de raízes adventícias mostrou valores de R^2 menores, 0,13, 0,09 e 0,08 quando comparamos com os mesmos parâmetros foliares acima, sinalizando uma baixa correlação com o desenvolvimento das mesmas. O crescimento dos calos também apresentou valores baixos de R^2 , 0,06, 0,21 e 0,15 evidenciando não haver uma correlação entre complexidade da folha e desenvolvimento dos mesmos (Figura 19).

Figura 19 – Correlação entre peso fresco da folha, área foliar, perímetro foliar e a capacidade de formação de gemas caulinares (SIM), raízes (RIM) e crescimento de calos (CIM). Podemos observar que existe uma maior correlação entre a capacidade de formação de gemas caulinares *in vitro* e o aumento de complexidade das folhas. Dados utilizados para o cálculo de R^2 se referem a média de cada genótipo nos experimentos anteriores

5 DISCUSSÃO

A base genética da arquitetura foliar nos mutantes estudados

A formação da folha é um evento espaço/temporal que tem vários fatores envolvidos de forma sincronizada, alguns desses fatores são moléculas que atuam em vários níveis celulares, como hormônios e fatores de transcrição. Plantas de tomateiro portando o alelo defeutivo do gene *La*, que codifica um fator de transcrição (FT) do tipo TCP, apresentam folhas mais simples em decorrência de uma atividade mais acentuada desse FT no início do desenvolvimento do primórdio foliar quando comparado ao tipo selvagem. A maior atividade do alelo *La* se deve a perda de sua regulação pelo gene *miR319*, isso faz com que as células ao longo da “*blastozone*” se diferenciem e não consigam formar os folíolos, já que, a janela morfogênética se encerra mais rapidamente (ORI et al., 2007).

A perda de função do fator de transcrição AUX/IAA9 de tomateiro faz com que os picos de auxina necessários para a formação de folhas e folíolos não sejam adequados. Além disso, a expressão desse gene ao longo da “*blastozone*” delimita as regiões de expansão da lâmina foliar o que não acontece em *entire* (KOENIG et al., 2009). O hormônio auxina tem importante papel na morfogênese foliar, sua distribuição e gradiente levam a uma cadeia de eventos, *e.g.*: repressão (*AUX/IAA*) e expressão (*NAM/CUC3*) de genes que atuam no desenvolvimento do novo órgão.

A expressão ectópica do fator de transcrição Tkn2 em *Me* aumenta a janela temporal para que novos folíolos e folíolos sejam formados, aumentando a complexidade das folhas. A citocinina (CK) é um conhecido elicitor do ciclo celular (SCHALLER et al., 2014) e atua na indiferenciação das células do meristema apical caulinar (MAC). Os genes *KNOX*, por sua vez, são conhecidos por favorecer a biossíntese de CK (YANAI et al., 2005), sendo essa correlação tida como motor da capacidade organogenética das folhas compostas de tomateiro (SHANI et al., 2010). Por outro lado, a giberelina (GA) é conhecida como promotora de expansão e diferenciação celular e tem uma ação antagonística a *KNOX*, uma vez que, altos níveis de GA inibem *KNOX* e, esses reprimem o gene *GA20ox*, o qual faz parte da via biossintética de GA (HAY et al., 2002). Esse antagonismo reflete na capacidade morfogênética de plantas com resposta constitutiva a GA, como no caso do mutante *pro*, fazendo com que haja uma simplificação da folha.

A altura média das plantas dos mutantes com maior complexidade foliar apresentam os menores valores. Interessantemente essas mutações estão associadas com fatores de transcrição do tipo KNOX, sendo uma de suas características o retardamento do crescimento. O genótipo *Me*, segundo Parnis et al. (1997) tem de duas a seis folhas (*i.e.*, entrenós), o que indica que o caule principal é menor que o usual. Por outro lado, para o mutante *clausa* não há nenhum relato na literatura referente a estatura das plantas.

Diferentemente, as plantas de *entire* e *procera*, com menor complexidade, apresentaram as maiores médias de altura, sendo que esse fenótipo já havia sido descrito previamente em tomateiro em plantas anti sense para *IAA9* (WANG et al., 2005) e em ensaios de crescimento de caule e entrenó (JUPE et al., 1988). O peso fresco do caule é menor para as plantas com menor altura, *Me* e *clau*, mas essa mesma correlação não é válida para o oposto, já que, *pro* com a maior média de altura não diferiu dos demais em peso. A maior complexidade foliar associada com menor peso fresco do caule não é explorada de forma direta e clara na literatura e a explicação para tal não parece simples. Uma relação plausível para as plantas com menor altura e peso fresco do caule é que a expressão ectópica de KNOXI faça com que as células permaneçam menos diferenciadas, o que pode ter reflexo direto no tamanho e peso final dos órgãos.

Não há uma correlação entre o comprimento do entrenó e a arquitetura foliar, sendo que os únicos materiais que apresentaram diferenças significativas foram *pro* e *clau*. A sinalização de GA é conhecida por afetar a diferenciação das células, no caso do caule, ela aumenta o número e o tamanho das células em tomateiro, aumentando assim o comprimento dos entrenós (JUPE et al., 1988). Apesar do menor comprimento do terceiro entrenó de *clausa*, a grande variação do mesmo pode indicar uma amostragem pequena ou uma característica intrínseca do genótipo, o que parece não ser um fator decisivo na altura das plantas.

Plantas de tomateiro *anti-sense* para *IAA9* foram reportadas tendo um aumento no comprimento dos entrenós na cv. MT (WANG et al., 2005), o que não é observado nos experimentos aqui realizados com *entire*. Essa discrepância pode ser devida a intensidade com que o transgênico suprime os transcritos do gene em questão. Além disso, a supressão parcial pode ter efeito diferente da perda de função como ocorre naturalmente em *entire*.

O impacto das mutações estudadas na terminação do meristema vegetativo e crescimento de gemas axilares

Muitos fatores influenciam na quantidade de folhas até a primeira inflorescência. A cv. MT tem hábito de crescimento determinado, isto é, após a emissão de duas inflorescência consecutivas, o crescimento do caule principal sessa. Essa característica se deve a uma mutação no gene *Self pruning* (*SP*) que codifica um fator de transcrição da família CETS, que atua como um repressor do florescimento e é requerido para manter, embora de modo cíclico, o hábito de crescimento indeterminado do tomateiro (PNUELI et al., 1998, 2001; CARMEL-GOREN et al., 2003; LIFSCHITZ et al., 2006).

A menor quantidade de folhas seguida do aparecimento de um meristema floral já havia sido reportado em *Me* (PARNIS et al., 1997) e o mutante *clausa* possui “*epiphyllus inflorescence*” (AVIVI et al., 2000) no lugar de inflorescências. Apesar disso, o número de folhas até a primeira inflorescência não é reportado em *clau* e a natureza do fenômeno homeótico (i.e. a presença de um órgão em local onde, usualmente, este não se desenvolve) não é conhecida a fundo. A rápida determinação do MAC em meristema floral e aparecimento de meristemas florais ectópicos é usualmente relatada em plantas com superexpressão de *Tkn2* (PARNIS et al., 1997; JANSSEN et al., 1998), mas esse mesmo fenômeno não é descrito para plantas superexpressando *Kn1* ou *Tkn1* (JANSSEN et al., 1998; KIMURA et al., 2008), o que indica uma maior influência de *Tkn2* na formação de meristemas florais. O número de folhas até a determinação parece ter correlação inversa com a complexidade foliar, com excessão de *potato-leaf*. O número de folhas (entrenós) parece explicar melhor os resultados de altura e peso descritos anteriormente, mostrando que genes *KNOX1* influenciam muito no desenvolvimento da parte aérea da planta.

O desenvolvimento das gemas axilares não parece ter relação com a complexidade das folhas, uma vez que, *entire* e *potato-leaf*, ambos genótipos com pouca dissecação foliar, tem diferentes padrões de desenvolvimento desses meristemas laterais. O crescimento das gemas tem maior relação com a sinalização hormonal ou genética com a qual cada mutação está envolvida. A auxina é reportada há tempos como sendo uma moduladora da dominância apical (THIMANN e SKOOG, 1933). Atualmente dois mecanismos de controle da dominância apical propostos são, “*Auxin transport canalization-based model*” e “*The second messenger model*” (LI e BANGERTH, 1999; SACHS e THIMANN, 1967; DOMAGALSKA e LEYSER 2011). No primeiro caso, de forma simplificada, o transporte de auxina determina qual ou quais gemas iram se desenvolver. Já no segundo modelo a auxina funciona como regulador de um segundo mensageiro que age diretamente sobre a atividade das gemas, sendo que, dois candidatos a tal mensageiros são as citocininas e as estrigolactonas. Ambos os modelos não são mutuamente exclusivos, sendo que, sobreposições são encontradas. Vale a

pena ressaltar que o processo de formação das gemas não parece estar envolvido com o proposto acima, uma vez que, as gemas já se encontram formadas mas dormentes. Outras abordagens precisam ser realizadas para se entender, por exemplo, como a mutação em *entire* afeta o desenvolvimento das gemas axilares, como no contexto dos dois modelos acima mencionados.

Outro mutante que não exhibe crescimento das gemas axilares de forma mais drástica que *entire* é *procera*. Esse aspecto de não crescimento de ramos laterais (*e.g.* gemas axilares), não é entendido claramente. Yanai et al. (2011) demonstraram, em tomateiro, que GA parcialmente media a resposta de *La*, através da supressão de *miR319*. Tal informação pode ajudar a entender como a resposta a GA atuaria no crescimento das gemas axilares, mas, plantas de *La* não reprimem o crescimento de gemas axilares como *pro* (dados não apresentados). Isto leva a crer que o TCP4, codificado por LA, não é um fator preponderante no desenvolvimento das gemas axilares, diferentemente de outros membros dessa família, tais como: *TEOSINTE BRANCHED1* de milho (DOEBLEY et al., 1997), *BRANCHED1* de *Arabidopsis* (AGUILAR-MARTINEZ et al., 2007; FINLAYSON, 2007), e *BRANCHED1-Like* de tomate (MARTÍN-TRILLO et al., 2011).

Outra hipótese para a resposta a GA no desenvolvimento dos meristemas laterais envolve seu antagonismo com CK, como ocorre no desenvolvimento foliar. A resposta constitutiva a GA pode diminuir a biossíntese de CK e, de acordo com a hipótese “*The second messenger model*” da dominância apical, a citocinina é necessária para que haja o crescimento da gema lateral. As respostas obtidas por *Me* e *clau* podem ser explicadas pela provável maior concentração de citocinina, que pode estar atuando como fator decisivo no desenvolvimento das gemas. A relação existente entre resposta CK e AUX, como relatado em um trabalho que correlaciona aplicação de citocinina nas gemas com a elevação da resposta local de auxina e assim propiciando o crescimento (LI e BANGERTH, 2003; DOMAGALSKA e LEYSER 2011), é mais uma das possíveis hipóteses para o que foi observado em *Me* e *clau*.

A medição da complexidade foliar

Ao analisarmos parâmetros de complexidade foliar notamos que existe uma correlação entre os valores observados e o grau de dissecação da folha. Vários estudos são feitos para o entendimento dos mecanismos pelos quais as folhas divergem tanto morfológicamente, mas muitas vezes, pelo fato de visualmente elas já diferirem entre si, outras abordagens para

mensurar essas discrepâncias não são utilizadas. Comparações de peso foliar são raras, porém dão um indicativo de como as plantas podem estar controlando sua janela formogenética, uma vez que, conforme constatado neste trabalho, as duas primeiras folhas de todos os genótipos não variaram significativamente. Com excessão de *clau* e *Me*, todos os demais genótipos apresentam um aumento gradativo de peso nas folhas analisadas, indicando que a heteroblastia (diferença gradativa de complexidade foliar ao longo do eixo principal de crescimento) ocorre de modo diferente entre eles. Outras peculiaridades encontradas com esse dado são a diminuição no peso a partir da terceira folha de *Me* e a constância dessa variável a partir da segunda folha de *clausa*.

O fenômeno do maior peso de *Me* a partir da terceira folha pode ser explicado em parte pelo efeito de dose do gene *TKn2*. Plantas homozigotas não têm folhas tão compostas (PARNIS et al., 1997) demonstrando que uma grande janela formogenética e lenta diferenciação afetam a complexidade da folha (*e.g.* peso fresco, área e perímetro foliar). Por outro lado, o fenótipo observado em *clau* apesar de estar relacionado à expressão ectópica de *TKn2*, é um fenômeno de difícil explicação, assim como seu menor número de folhas no eixo principal e grande crescimento das gemas axilares.

A área e perímetro foliar seguem a mesma tendência de grandeza em todos os genótipos, mas o mesmo não é verdadeiro para a variável peso fresco da folha, pois o mutante *entire* possui as menores médias de área e perímetro foliar, o que nos levaria a crer que ele também apresentaria um menor peso fresco, o que não ocorre. Outras abordagens, como experimentos anatômicos, são necessários para entender como essas plantas tem área foliar específica (peso g/ área foliar cm²) distintas. Essas informações podem ser úteis para o entendimento da ação dos genes envolvidos com arquitetura foliar no desenvolvimento.

Impacto das mutações estudadas na formação de órgão adventícios e crescimento de calos

O processo de regeneração *in vitro* de raízes adventícias (RA) não tem uma correlação clara com o grau de complexidade foliar, mas sim com o balanço voltado para auxina, como observado em *entire*, ou com a competência e sinalização celular para assumir uma via de desenvolvimento, como proposto previamente em *pro*. O mutante *entire* com uma menor complexidade foliar tem a maior quantidade de raízes por explante, enquanto *Me* com folhas mais elaboradas, apresenta menos raízes que MT. Esse resultado corrobora com o obtido por Lombardi-Crestana et al. (2009), apesar de a diferença na capacidade organogenética entre *e* e *Me* ser constatada apenas quando contamos o número de raízes por explante.

A formação de raízes adventícias é influenciada por fatores abióticos e bióticos, sendo que dentre os bióticos, o hormônio auxina apresenta grande importância no controle da formação desse órgão. A via de formação de RAs parece ser independente da de raízes laterais (RL), uma vez que, o mutante *monopteros* de *Arabidopsis thaliana* falha na formação da raiz primária (RP), mas não exibem alterações na formação de RAs (PRZEMECK et al., 1996). Além disso, mutantes de milho e arroz que apresentam alterações no desenvolvimento de “*crown roots*”, mas não no de RP e RLs e, vice-versa (BELLINI et al., 2014), corroboram com essa hipótese.

Estudos tem demonstrado que uma ou mais vias de desenvolvimento para a formação de RAs em *Arabidopsis*, é modulada por auxina, mais especificamente através de ARFs e miRNAs (GUTIERREZ et al., 2009) e da homeostase de ácido jasmônico (AJ) (GUTIERREZ et al., 2012). As consequências da perda de função do *AUX/IAA9* em *entire* não são conhecidas. Como os genes da família *AUX/IAA* atuam como repressores transcricionais da via de transdução de sinal de auxina, seu efeito pode aumentar a ação de ARFs envolvidos na organogênese de raízes adventícias. Além disso, essa perda de função pode alterar a homeostase com outras moléculas sinalizadoras como miRNAs, AJ e estrigolactonas, sendo que as duas últimas já foram reportadas como repressoras da formação de RAs em algumas espécies, inclusive em tomateiro (BELLINI et al., 2014).

Apesar de *Me* não apresentar diferenças entre MT e *entire* quanto a porcentagem de explantes com raízes, fica evidente a influência dos genes *KNOX* na capacidade de formação de RAs *in vitro*. Embora *TKn2* seja um promotor da manutenção de células meristemáticas do MAC, entre outros locais, os explantes de *Me* não formam tantas RAs como acontece em *entire*, provavelmente por seu efeito na produção de CK, que propende a um crosstalk diferente, evitando o gradiente de auxina necessário para a formação do primórdio radicular, como acontece em *Arabidopsis* (LAPLAZE et al., 2007).

O mutante *procera* exibe as menores taxas de regeneração de RAs, sendo que, em espécies como arroz e álamo, aplicações exógenas de GA inibem a formação RAs, assim como, mutantes deficientes na biossíntese de GA desenvolvem mais RAs (LO et al. 2008; BUSOV et al., 2006; BELLINI et al., 2014). Crestana et al. (2012) propõem que *procera* age como um repressor da competência para as células assumirem uma via de desenvolvimento (e.g. formação de raízes e gemas), o que explica sua baixa taxa de formação de raízes. Além disso, as raízes de *pro* denotam ter poucos pêlos radiculares quando comparada aos outros genótipos, o que indica outro aspecto que pode ser afetado pela via de transdução de sinal de giberelina. O mutante *potato-leaf* apresenta uma notável diminuição na capacidade de formar

raízes adventícias. Contudo, os trabalhos descrevendo a relação dos fatores de transcrição do tipo MYB com desenvolvimento da raiz reportam alterações na formação de “*hair roots*” em *Arabidopsis* (FELLER et al., 2011), porém a relação destes com formação de RAs não é conhecida.

A capacidade de regeneração *in vitro* de gemas caulinares adventícias também não apresenta uma relação evidente com o grau de complexidade foliar, dependendo também da competência e sinalização celular para assumir uma via de desenvolvimento. O mutante *Me* com a folha mais elaborada possui a maior capacidade de regeneração de gemas. Por outro lado, *entire* mesmo apresentando folhas mais simples não diferiu significativamente de MT nessa variável.

A formação de gemas caulinares adventícias não parece seguir a mesma via de desenvolvimento do meristema apical, uma vez que, em *Arabidopsis* a formação de gemas caulinares adventícias provem de células períciclicas com organização e expressão gênica semelhantes ao encontrado em meristemas de raízes laterais, que posteriormente sofrem uma reprogramação para formar meristemas caulinares (ATA et al., 2009). Em várias espécies cultivadas *in vitro* a suplementação de CK exógena leva a formação de gemas caulinares adventícias. Essa capacidade se deve, em parte, a regulação positiva que CK exerce em genes chave no desenvolvimento e manutenção de um novo meristema. Em *Arabidopsis*, alguns desses genes são *WUSCHEL* (*WUS*) e *CLAVATA3* (*CLV3*) que controlam o destino das células meristemáticas no MAC (SABLOWSKI 2007) e *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) que atua na formação, manutenção da divisão e prevenção da diferenciação celular no MAC (BARTON e POETHIG 1993; ENDRIZZI et al., 1996; SABLOWSKI 2007). Em tomateiro, a organização espacial dos genes citados acima no MAC segue o mesmo padrão de *Arabidopsis*, como evidencia a expressão do gene homólogo ao *STM*, *TKn2* (REINHARDT et al., 2003). Interessantemente, Reinhardt et al. (2003) demonstraram que após danificação da região onde *WUS* é expresso no MAC uma ou duas novas regiões de expressão desse gene são formadas, dando origem a novos meristemas.

Como já discutido anteriormente, *Me* apresenta uma expressão ectópica de *TKn2*, que leva a um aumento na produção de CKs em um “*loop*” positivo. Além disso, é conhecido que certos *Arabidopsis* Response Regulators (ARRs), cuja atividade é modulada por CKs, regulam e são regulados pelo gene *WUS* (LEIBFRIED et al., 2005). Logo, a maior porcentagem e quantidade de gemas caulinares observadas em *Me* pode ser explicada, pelo menos em parte, por um “*feedback*” positivo relacionado ao aumento de CKs estimulando genes indispensáveis a formação e manutenção de um novo meristema.

A auxina também tem um importante papel na regulação do MAC em *Arabidopsis*. *ARF5/MONOPTEROS* regula a transcrição de *ARR7* e *ARR15*, que são por sua vez reguladores negativos de resposta a CK (ZHAO et al., 2010). Além disso, um aumento da atividade de *ARR7* leva a uma diminuição na expressão de *WUS* (LEIBFRIED et al., 2005), o que ajuda a evidenciar parte dos mecanismos pelos quais esses dois hormônios controlam o MAC. Nesse sentido, a perda de função do *AUX/IAA9* em tomateiro não parece ter influência na formação de novos meristemas caulinares *in vitro*, como ocorre no processo de formação de raízes adventícias. Essa disparidade leva a crer que as vias organogênicas de formação de MAC e gemas caulinares adventícias são independentes e a perda de função de um repressor de ARFs em *entire* parece não afetar de forma drástica a formação de gemas adventícias. Por outro lado, *procera* exibe as menores taxas de regeneração de gemas caulinares, o que é associado com perda de competência na via organogênica proposta no trabalho de Lombardi-Crestana et al. (2012). A relação entre os hormônios CK e GA e a relação de ambos com genes *KNOX*, como acontece em *Arabidopsis* e milho (JASINSKI et al., 2005; BOLDUC e HAKE 2009), são uma boa hipótese para explicar a menor formação de gemas caulinares adventícias em *procera*, uma vez que, uma menor resposta via CK pode ter influência direta em genes chave na organização do MAC, como *WUS*.

Fleishon et al. (2011) demonstram que a complexidade da folha de tomateiro com relação ao “*crosstalk*” entre GA e CK parece ser independente de *DELLA*, visto que, o mutante *pro* não alterou os níveis de expressão de genes ligados a resposta de CK em tomateiro (TRRs), ao passo que, doses exógenas de *GA₃* reprimiram a resposta. Outros estudos demonstram que um provável mecanismo de ação pelo qual GA pode agir, é inibir a expressão do gene *miR319*, um regulador negativo da expressão de *La*, que afeta diretamente capacidade morfogênica das folhas (YANAI et al., 2011). Ambos os processos relatados acima quanto a organogênese foliar podem ter influência na formação de órgãos *in vitro*, contudo, novos estudos precisam ser realizados para descartar ou aprofundar essas relações e compreender o papel da sinalização de GA na organogênese *in vitro*.

A capacidade de crescimento dos calos é afetada pelo meio no qual eles crescem em conjunto com o genótipo utilizado. Os calos crescidos em CIM praticamente não variaram em peso final. Por outro lado, os que foram posteriormente transferidos para SIM cresceram mais quando comparados ao primeiro caso. Desde o trabalho de Skog e Miller (1957) em que foi demonstrado que o balanço entre auxina e citocina exógena determina o destino celular no cultivo *in vitro* e, concentrações intermediárias entre esses dois hormônios levam a formação de calos, mecanismos a nível molecular controlando sua formação vem sendo desvendados.

Em *Arabidopsis*, explantes radiculares ou caulinares cultivados em CIM formam calos advindos de células pericíclicas adjacentes aos polos de protoxilema, cuja organização é parecida com a de um primórdio de raiz lateral e, seu padrão de expressão gênica é semelhante ao de um meristema de raiz lateral (ATA et al., 2009).

Um dos mecanismos que descrevem como auxina age no contexto de genes ligados a formação de raízes laterais para reativar o ciclo celular é descrito por Berckmans et al. (2011), no qual a auxina modula a expressão dos fatores de transcrição LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD)/ ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE (ASL), LBD18 e LBD33, que por sua vez ativam outro fator de transcrição, E2 PROMOTER BINDING FACTOR a (E2Fa) (revisado em IKEUCHI et al. 2013). Em *Arabidopsis* os fatores de transcrição E2Fa dimerizam com proteínas DIMERIZATION PARTNER (DP), que por sua vez promovem a transcrição de genes necessários a replicação do DNA (IKEUCHI et al., 2013). Fan et al., 2012 mostram que existe uma regulação positiva de alguns LBDs em CIM e que a superexpressão de cada um dos LBDs positivamente regulados leva à formação de calos sem adição de hormônios exógenos, com aparência semelhante aos formados em meio CIM.

Os mecanismos moleculares pelos quais a citocinina induz a formação de calos ainda não são muito claros. Entretanto, uma peça chave nesses mecanismos são os fatores de transcrição ARRs tipo-B, pois, a superexpressão de ARR21, que perdeu o domínio de fosforilação em *Arabidopsis* forma calos em meio de cultura sem hormônios (TAJIMA et al., 2004). Um dos possíveis alvos desses ARRs são as ciclinas tipo-D, uma vez que, CYCD3 é positivamente regulada uma hora após o tratamento com CK e a superexpressão dessa ciclina aumenta a formação de calos sem a necessidade de citocinina exógena (RIOU-KHAMLIHI et al., 1999; revisado em IKEUCHI et al., 2013).

A ligeira diferença entre os tratamentos que cresceram em meio CIM denota que nenhuma das mutações investigadas teve grande impacto no crescimento dos calos. Por outro lado, o crescimento dos calos em SIM demonstrou que a troca de meio CIM (mais auxina) para SIM (citocinina) aumentou o peso final desses, indicando que a CK teve um papel decisivo no aumento da taxa de divisão e/ou expansão celular. Além disso, podemos notar que mutantes como *procera* e *clau* foram mais e menos reponsíveis, respectivamente, a mudança de meio, indicando um possível mecanismo de antagonismo ou repressão na via pela qual CK age sobre o desenvolvimento dos calos quando ocorre a mudança de meio. Peres et al. (2001) e Lima et al. (2009) mostram que a formação de calos é prejudicial à formação de gemas caulinares em tomateiro, e a menor capacidade de formação de gemas caulinares adventícias de *pro* em SIM pode ser relacionado a sua maior formação de calos como observado acima.

Contudo, é importante ressaltar que as vias pelas quais esses dois eventos ocorrem são provavelmente distintas (*e.g.* formação e crescimento de calos; formação de gemas caulinares adventícias), cabendo um estudo mais detalhado para constatar similaridades e/ou disparidades.

Os mutantes em arquitetura foliar exibem características fenotípicas que convergem e divergem quando vistos *ex vitro* e *in vitro*. Em materiais *in vitro* pode-se notar que todos apresentam disformidades nas gemas caulinares, seja na forma das mesmas ou na das folhas adjacentes. No genótipo *Me* essas disformidades *in vitro* são reduzidas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) auxilia a entendermos a importância de TKn2 tanto no desenvolvimento *ex vitro* quanto no *in vitro*, uma vez que, as gemas caulinares adventícias de *Me* são as que apresentam a estrutura mais parecida e desenvolvida *in vitro*, quando comparadas com MAC de plântulas oriundas de semente. Outra característica notada nas MEV, que corrobora com dados anteriormente discutidos, é a presença de meristemas florais em *Me*, em ambas as condições (*in vitro* e *ex vitro*), o que caracteriza uma rápida determinação das plantas.

Em *entire*, as MEV evidenciaram um crescimento ectópico da lâmina foliar em áreas em que isso não deveria acontecer, o que afeta diretamente a área e perímetro foliar, tornando as folhas mais simples. O estágio vegetativo dos meristemas em ambas as condições ajuda a explicar o porque *entire* possui maior altura e número de folhas quando comparados a outros genótipos. Além disso, o aparecimento de gemas axilares nas folhas das gemas adventícias *in vitro* de *e* reforça as idéias de que os programas utilizados para a formação de ambas as estruturas são divergentes e que a dominância apical em conjunto com um possível efeito de sua mutação, explicaria o não crescimento das gemas axilares *ex vitro*, como visto anteriormente.

Ao observarmos as MEV *ex vitro* de *procera*, nota-se um aparente atraso na iniciação dos folíolos, apesar de a identificação das folhas em ordem cronológica de aparecimento não ter sido feita, com uma maior expansão das células no sentido distal das folhas. O meristema apical se encontra em estágio vegetativo, a exemplo de *e*, o que também ajuda a entender o maior número de folhas e altura, aos 65 dias após a semeadura. Nos materiais *in vitro*, as gemas na maioria das vezes são de difícil visualização, com estruturas lembrando folhas mal formadas e sem a presença de meristemas axilares nas mesmas. A única semelhança, porém não tão evidente entre ambas as circunstâncias, é o atraso no desenvolvimento dos folíolos *ex vitro* e das folhas adjacentes *in vitro*. Esse atraso no desenvolvimento pode ter um paralelo com os resultados obtidos no desenvolvimento das gemas axilares *ex vitro*, abrindo caminho

para uma possível investigação de mecanismos comuns pelos quais as gemas axilares nas folhas e nas gemas adventícias são inibidas.

O mutante *clau* foi o que apresentou a transição de meristema vegetativo para reprodutivo mais rápida, de acordo com as MEV *ex vitro*, corroborando com os dados de altura e número de folhas até a determinação. *In vitro*, os meristemas florais sem organização aparente e falta de folhas adjacentes, dificulta uma correlação entre ambas as condições, a não ser pelo surgimento dos próprios meristemas florais. Em *potato-leaf*, apesar do meristema floral estar em um estágio inicial de desenvolvimento *ex vitro*, ao compararmos com o meristema *in vitro*, notamos uma clara desorganização neste último, com prevalência de meristemas florais mais desenvolvidos que os demais genótipos em certas regiões. Essa constatação é de difícil interpretação e correlação com ambas as situações devido a variação de estruturas encontradas *in vitro*. Contudo, um estudo mais detalhado desse aspecto pode revelar possíveis interações entre fatores de transcrição do tipo MYB e a formação de gemas adventícias.

Quando avaliamos em conjunto os dados podemos notar que a complexidade foliar não afeta a capacidade de regeneração *in vitro* de forma ampla. O processo de organogênese *in vitro* é postulado em etapas e os diferentes genótipos avaliados provavelmente afetam o processo em diferentes pontos, sendo que nenhum deles foi capaz de obter, ao mesmo tempo, altas taxas de regeneração de raízes e gemas caulinares adventícias, como ocorre por exemplo com a variação alélica natural *RGI* (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012). Ao refletir sobre os dados obtidos podemos formular a hipótese de que os mutantes *Me* e *entire* afetam o processo de organogênese *in vitro* na etapa da indução de gemas e raízes adventícias, respectivamente, ao passo que *procera* atuaria na fase de competência ou atrasando o desenvolvimento. Esse possível atraso só pode ser constatado em gemas caulinares adventícias, uma vez que, MEV de raízes não foram feitas. Em trabalho realizado por Azevedo M.S. (dados não publicados) evidencia que a capacidade de formação de raízes em *pro* não é menor quando comparada a MT, e sim sofre um atraso no desenvolvimento. Ao revermos o proposto por Lombardi-Crestana et al. (2012), constatamos que há uma ação contrária de *RGI* e *procera* na fase de aquisição de competência para formar um órgão, porém se *pro* afetasse a competência como os autores acima mencionados propõem, a formação de raízes seria afetada mesmo após um maior período de cultivo, o que não ocorre de acordo com os dados obtidos por Azevedo. A restauração da capacidade organogenética de *pro* através do cruzamento com *RGI* (LOMBARDI-CRESTANA et al., 2012), de acordo com o aqui

hipotetizado, se daria a nível de restabelecimento do crescimento de órgãos adventícios delibitada por *pro*.

Um estudo morfológico mais detalhado da morfogênese de *procera* é necessário para averiguar se realmente menos gemas são formadas ou se elas somente não se desenvolvem. Além disso, estudos moleculares devem ser conduzidos em conjunto para determinar se as vias pelas quais *pro* e *RGI* agem são independentes ou não, e em que ponto uma pode se sobrepor a outra. Quando olhamos os genótipos utilizados no contexto dos experimentos notamos o quanto cada mutação pode afetar o desenvolvimento das plantas. Os diferentes órgãos formados em uma planta recrutam genes e moléculas de formas distintas, em janelas espaço/temporais diferentes. Uma investigação mais aprofundada e rigorosa precisa ser realizada para comprovar se mecanismos vistos em outras espécies são equivalentes em tomateiro ou se atuam de forma diferente ou até mesmo em outras vias de desenvolvimento.

6 CONCLUSÕES

A capacidade de regeneração de gemas caulinares e raízes adventícias *in vitro* dos diferentes genótipos afetando a arquitetura foliar não é devido ao grau de dissecação foliar dos mesmos, mas sim pelo tipo de mutação que cada um carrega.

O crescimento de calos em CIM não parece sofrer efeito das mutações envolvidas mas, a mudança de meio para SIM acarreta um aumento no peso final de todos os genótipos testados, ocorrendo variações de reposta que indicam uma diferente sensibilidade de reposta a citocinina.

Provavelmente *Me* e *e* agem a nível de indução de gemas caulinares e raízes adventícias, respectivamente, ao passo que, *pro* agiria a nível de competência ou retardo de desenvolvimento pós-indução.

Tkn2 tem um importante papel no estabelecimento e manutenção de meristemas caulinares adventícios *in vitro*.

Os genes e moléculas recrutados no processo de organogênese *ex vitro* (*e.g.* formação das folhas, meristema apical caulinar, gemas axilares, raízes laterais etc.) são diferentes dos que atuam *in vitro* ou atuam em uma escala espaço/temporal diferente.

REFERÊNCIAS

- ATTA, R.; LAURENS, L.; BOUCHERON-DUBUISSON, E.; GUIVARC'H, A.; CARNERO, E.; GIRAUDAT-PAUTOT, V.; RECH, P.; CHRIQUI, D. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, p. 626-644, 2009.
- AVIVI, Y.; LEV-YADUN, S.; MOROZOVA, N.; LIBS, L.; WILLIAMS, L.; ZHAO, J.; VARGHESE, G.; GRAFI, G. *Clausa*, a Tomato Mutant with a Wide Range of Phenotypic Perturbations, Displays a Cell Type- Dependent Expression of the Homeobox Gene *LeT6/TKn2*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 541-552, 2000.
- BARTON, M.K.; POETHIG, R.S. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. **Development**, Cambridge, v. 119, p. 823-831, 1993.
- BELLINI, C.; PACURAR, D.I.; PERRONE, I. Adventitious Roots and Lateral Roots: Similarities and Differences. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 639-666, 2014.
- BERCKMANS, B.; VASSILEVA, V.; SCHMID, S.P.C.; MAES, S.; PARIZOT, B.; NARAMOTO, S.; MAGYAR, Z.; KAMEI, C.L.A.; KONCZ, C.; BOGRE, L.; PERSIAU, G.; DE JAEGER, G.; FRIML, J.; SIMON, R.; BEECKMAN, T.; DE VEYLDERA, L. Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of *Arabidopsis E2Fa* by Lateral Organ Boundary Proteins. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3671-3683, 2011.
- BOLDUC, N.; HAKE, S. The Maize Transcription Factor KNOTTED1 Directly Regulates the Gibberellin Catabolism Gene *ga2ox1*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 1647-1658, 2009.
- BOOKER, J.; CHATFIELD, S.; LEYSER, O. Auxin Acts in Xylem-Associated or Medullary Cells to Mediate Apical Dominance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 495-507, 2003.
- BUSCH, B. L.; SCHMITZ, G.; ROSSMANN, S.; PIRON, F.; DING, J.; BENDAHMANE, A.; THERES, K. Shoot Branching and Leaf Dissection in Tomato Are Regulated by Homologous Gene Modules. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, p. 3595-3609, 2011.
- BUSOV, V.; MEILAN, R.; PEARCE, D.W.; ROOD, S.B.; MA, C.; TSCHAPLINSKI, T.J.; STRAUSS, S.H. Transgenic modification of *gai* or *rgl1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus*. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 288-299, 2006.
- CARMEL-GOREN, L.; LIU, Y. S.; LIFSCHITZ, E.; ZAMIR, D. The *SELF PRUNING* gene family in tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, p. 1215-1222, 2003.
- CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; PINO, L.E.; CRESTANA, S.L.; ZSOGON, A.; LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, p. 18, 2011.

- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, Alexandria, v. 23, p. 515-519, 1988.
- COCKING, E.C. A Method for the Isolation of Plant Protoplasts and Vacuoles. **Nature**, London, v. 187, p. 962-963, 1960.
- CUBAS, P.; LAUTER, N.; DOEBLEY, J.; COEN, E. The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 215–222, 1999.
- DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, London, v. 436, p. 441-451, 2005.
- DOEBLEY, J.; STEC, A.; HUBBARD, L. The evolution of apical dominance in maize. **Nature**, London, v. 386, p. 485–488, 1997.
- Domagalska, M.A.; Leyser, O. Signal integration in the control of shoot branching. **Nature Molecular Cell Biology**, London, v. 12, p. 211-221, 2011.
- EMMANUEL, E.; LEVY, A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion Plant Biology**, London, v. 5, p. 112-117, 2002.
- ENDRIZZI, K.; MOUSSIAN, B.; HAECKER, A.; LEVIN, J.Z.; LAUX, T. The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 967-979, 1996.
- FAN, M.; XU, C.; XU, K.; HU, Y. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. **Nature Cell Research**, London, v. 22, p. 1169-1180, 2012.
- FELLER, A.; MACHEMER K.; BRAUN, E.L.; GROTEWOLD E. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. **The Plant Journal**, Oxford, v. 66, p. 94-116, 2011.
- FINLAYSON, S.A. *Arabidopsis TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1* regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot *teosinte branched1*. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 48, p. 667-677, 2007.
- FLEISHON, S.; SHANI, E.; ORI, N.; WEISS, D. Negative reciprocal interactions between gibberellin and cytokinin in tomato. **New Phytologist**, Lancaster, v. 190, p. 609–617, 2011.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, London, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GUTIERREZ, L.; BUSSELL, J.D.; PACURAR, D.I.; SCHWAMBACH, J.; PACURAR, M., BELLINI, C. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 3119-3132, 2009.

GUTIERREZ, L.; MONGELARD, G.; FLOKOVÁ, K.; PĀCURAR, D.I.; NOVÁK, O.; STASWICK, P.; KOWALCZYK, M.; PĀCURAR, M.; DEMAILLY, H.; GEISS, G.; BELLINI, C. Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 24, p. 2515–2527, 2012.

GRAY, W.M.; KEPINSKI, S.; ROUSE, D.; LEYSER, O.; ESTELLE, M. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**, London, v. 414, p. 271–276, 2001.

GREENBOIM-WAINBERG, Y.; MAYMON, I.; BOROCHOV, R.; ALVAREZ, J.; OLSZEWSKI, N.; ORI, N.; ESHED, Y.; WEISS, D. Cross Talk between Gibberellin and Cytokinin: The *Arabidopsis* GA Response Inhibitor SPINDLY Plays a Positive Role in Cytokinin Signaling. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 92–102, 2005.

GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). **Planta**, Berlin, v. 107, p. 161–170, 1972.

GROTEWOLD, E.; DRUMMOND, B.J.; BOWEN, B.; PETERSON, T. The myb-Homologous P Gene Controls Phlobaphene Pigmentation in Maize Floral Organs by Directly Activating a Flavonoid Biosynthetic Gene Subset. **Cell**, Cambridge, v. 76, p. 543–553, 1994.

HAKE, S.; CHAR, B.; CHUCK, G.; FOSTER, T.; LONG, J.; JACKSON, D. Homeobox genes in the functioning of plant meristems. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 350, p. 45–51, 1995.

HAKE, S.; SMITH, H. M. S.; HOLTAN, H.; MAGNANI, E.; MELE, G.; RAMIREZ, J. The role of *KNOX* genes in plant development. **Annual review of cell and developmental biology**, Palo Alto, v. 20, p. 125–151, 2004.

HAKE, S.; VOLLBRECHT, E.; FREELING, M. Cloning Knotted, the dominant morphological mutant in maize using Ds2 as a transposon tag. **EMBO Journal**, Weinheim, v. 8, p. 15–22, 1989.

HARBERD, N.P.; BELFIELD, E.; YASUMURA, Y. The Angiosperm Gibberellin-GID1-DELLA Growth Regulatory Mechanism: How an “Inhibitor of an Inhibitor” Enables Flexible Response to Fluctuating Environments. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 1328–1339, 2009.

HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; PARNIS, A.; ESHED, Y.; LIFSCHITZ, E. The Making of a Compound Leaf: Genetic Manipulation of Leaf Architecture in Tomato. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 735–744, 1996.

HAY, A.; CRAFT, J.; TSIANTIS, M. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? **BioEssays**, Weinheim, v. 26, p. 395–404, 2004.

HAY, A.; KAUR, H.; PHILLIPS, A.; HEDDEN P.; HAKE, S.; TSIANTIS, M. The Gibberellin Pathway Mediates KNOTTED1-Type Homeobox Function in Plants with Different Body Plans. **Current Biology**, Cambridge, v. 12, p. 1557–1565, 2002.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, p. 3159-3173, 2013.

JANSSEN, B.-J.; LUND, L.; SINHA, N. Overexpression of a Homeobox Gene, *LeT6*, Reveals Indeterminate Features in the Tomato Compound Leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 771-786, 1998.

JASINSKI, S.; PIAZZA, P.; CRAFT, J.; HAY, A.; WOOLLEY, L.; RIEU, I.; PHILLIPS, A.; HEDDEN, P.; TSIAKANTIS, M. KNOX Action in *Arabidopsis* Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities. **Current Biology**, Cambridge, v. 15, p. 1560-1565, 2005.

JASINSKI, S.; TATTERSALL, A.; PIAZZA, P.; HAY, A.; MARTINEZ-GARCIA, J.F.; SCHMITZ, G.; THERES, K.; MCCORMICK, S.; TSIAKANTIS, M. *PROCERA* encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 56, p. 603-612, 2008.

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

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

KEPINSKI, S.; LEYSER, O. The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, London, v. 435, p. 446-451, 2005.

KERSTETTER, R.; VOLLBRECHT, E.; LOWE, B.; VEIT, B.; YAMAGUCHI, J.; HAKE, S. Sequence Analysis and Expression Patterns Divide the Maize knotted1-like Homeobox Genes into Two Classes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1877-1887, 1994.

KIMURA, S.; KOENING, D.; KANG, J.; YOONG, F.Y.; SINHA, N. Natural Variation in Leaf Morphology Results from Mutation of a Novel KNOX Gene. **Current Biology**, Cambridge, v. 18, p. 672-677, 2008.

KLEMPNAUER, K.-H.; GONDA, T.J.; BISHOP, J.M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. **Cell**, Cambridge, v. 31, p. 453-463, 1982.

KOENIG, D.; BAYER, E.; KANG, J.; KUHLEMEIER, C.; SINHA, N. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 2997-3006, 2009.

KOORNNEEF, M.; HANHART, C.J.; MARTINELLI, L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 74, p. 633-641, 1987.

KOSUGI, S.; OHASHI, Y. PCF1 and PCF2 Specifically Bind to cis Elements in the Rice Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1607-1619, 1997.

LAPLAZE, L.; BENKOVA, E.; CASIMIRO, I.; MAES, L.; VANNESTE, S.; SWARUP, R.; WEIJERS, D.; CALVO, V.; PARIZOT, B.; HERRERA-RODRIGUEZ, M.B.; OFFRINGA, R.; GRAHAM, N.; DOUMAS, P.; FRIML, J.; BOGUSZ, D.; BEECKMAN, T.; BENNETTE, M. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 3889-3900, 2007.

LEIBFRIED, A.; TO, J.P.C.; BUSCH, W.; STEHLING, S.; KEHLE, A.; DEMAR, M.; KIEBER, J.J.; LOHMANN, J.U. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. **Nature**, London, v. 438, p. 1172-1175, 2005.

LI, C.; BANGERTH, F. Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoot of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 106, p. 415-420, 1999.

LI, C.; BANGERTH, F. Stimulatory effect of cytokinins and interaction with IAA on the release of lateral buds of pea plants from apical dominance. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 160, p. 1059-1063, 2003.

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

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

LO, S-F.; YANG, S-Y.; CHEN, K-T.; HSING, Y-I.; ZEEVAART, J.A.D.; CHEN, L-J.; YUB, S-M. A Novel Class of Gibberellin 2-Oxidases Control Semidwarfism, Tillering, and Root Development in Rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, p. 2603-2618, 2008.

LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SILVA, G.F.F.; PINO, L.E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; FIGUEIRA, A.; NOGUEIRA, F.T.S.; PERES, L.E.P. The tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) natural genetic variation *Rgl* and the DELLA mutant *procera* control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 5689-5703, 2012.

MARTÍN-TRILLO, M.; CUBAS, P. TCP genes: a family snapshot ten years later. **Trends in Plant Science**, London, v. 15, p. 31-39, 2009.

MARCEL, F.; RODRÍGUEZ-BUEY, M.L.; SCHMITZ, G.; THERES, K.; BENDAHDANE, A.; DOPAZO, H.; CUBAS, P. Role of tomato BRANCHED1-like genes in the control of shoot branching. **The Plant Journal**, Oxford, v. 67, p. 701-714, 2011.

MARTÍN-TRILLO, M.; GRANDÍO, G.; SERRA, F. AGUILAR-MARTINEZ, J.A.; POZA-CARRION, C.; CUBAS, P. Arabidopsis BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. **The Plant Cell**, Rockville, v. 19, p. 458-472, 2007.

- MARTON, L.; WULLEMS, G.J.; MOLENDIJK, L.; SCHILPEROORT, R.A. *In vitro* transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 277, p. 129-131, 1979.
- MATHAN, D.S.; JENKINS, J.A. A morphogenetic study of *LANCEOLATE*, a leaf-shape mutant in the tomato. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 49, No. 5, p.504-514, 1962.
- MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* **Plant Cell Reports**, Knoxville, v. 5, p. 81-84, 1986.
- MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYYATUY, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.
- MÜLLER, D.; SCHMITZ, G.; THERES, K. Blind Homologous R2R3 Myb Genes Control the Pattern of Lateral Meristem Initiation in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 586–597, 2006.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.
- ORI, N.; COHEN, A.R.; ETZIONI, A.; BRAND, A.; YANAI, O.; SHLEIZER, S.; MENDA, N.; AMSELLEM, Z.; EFRONI, I.; PEKKER, I.; ALVAREZ, J.P.; BLUM, E.; ZAMIR, D.; ESHED, Y. Regulation of *LANCEOLATE* by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. **Nature Genetics**, London, v. 39, p. 787-791, 2007.
- PARNIS, A.; COHEN, O.; GUTFINGER, T.; HAREVEN, D.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The Dominant Developmental Mutants of Tomato, *Mouse-ear* and *Curl*, Are Associated with Distinct Modes of Abnormal Transcriptional Regulation of a *Knotted* Gene. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 2143-2158, 1997.
- PAZ-ARES, J.; GHOSAL, D.; WIENAND, U.; PETERSON, P.A.; SAEDLER, H. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. **EMBO Journal**, Weinheim, v. 6, p. 3553–3558, 1987.
- PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VAN SLUYS, M-A.; KRAUS, J.E.; VECHI, C. (2001) Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy roots of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Verona, v. 65, p. 37-44, 2001.
- PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato ‘Micro-Tom’ model system. **Plant Methods**, London, v. 6, p. 23, 2010.
- PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J.; GANAL, M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. **Development**, Cambridge, v. 125, p. 1979–1989, 1998.

PNUELI, L.; GUTFINGER, T.; HAREVEN, D.; BEN-NAIM, O.; RON, N.; ADIR, N.; LIFSCHITZ, E. Tomato *SP*-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2687–2702, 2001.

PRZEMECK, G.K.; MATTSSON, J.; HARDTKE, C.S.; SUNG, Z.R.; BERLETH, T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 229–237, 1996.

REID, J.B. Plant Hormone Mutants. **Journal of Plant Growth Regulation**, Verona, v. 12, p. 207–226, 1993.

REINHARDT, D.; FRENZ, M.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. **Development**, Cambridge, v. 130, p. 4073–4083, 2003.

RIOU-KHAMLI, C.; HUNTLEY, R.; JACQMARD, A.; MURRAY, J.A.H. Cytokinin Activation of *Arabidopsis* Cell Division Through a D-Type Cyclin. **Science**, Washington, v.283, p.1541–1544, 1999.

ROUSE, D.; MACKAY, P.; STIRNBERG, P.; ESTELLE, M.; LEYSER, O. Changes in auxin response from mutations in an AUX/IAA gene. **Science**, Washington, v. 279, p. 1371–1373, 1998.

SABLOWSKI, R. The dynamic plant stem cell niches. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, p. 639–644, 2007.

SACHS, T.; THIMANN, K. The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 54, p. 136–144, 1967.

SCHALLER, G.E.; STREET, I.H.; KIEBER, J.J. Cytokinin and the cell cycle. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.21, p. 7–15, 2014.

SHANI, E.; BEN-GERA, H.; SHLEIZER-BURKO, S.; BURKO, Y.; WEISS, D.; ORI, N. Cytokinin Regulates Compound Leaf Development in Tomato. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 3206–3217, 2010.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of the Society of Experimental Biology**, London, v. 11, p. 118–231, 1957.

SMITH, R.S. The Role of Auxin Transport in Plant Patterning Mechanisms. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 6, p. 2631–2633, 2008.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 45, p. 705–708, 1958.

SWARUP, K.; BENKOVÁ, E.; SWARUP, R.; CASIMIRO, I.; PÉRET, B.; YANG, Y.; PARRY, G.; NIELSEN, E.; DE SMET, I.; VANNESTE, S.; LEVESQUE, M.P.; CARRIER, J.F.

D.; JAMES, N.; CALVO, V.; LJUNG, K.; KRAMER, E.; ROBERTS, R.; GRAHAM, N.; MARILLONNET, S.; PATEL, K.; JONES, J.D.G.; TAYLOR, C.G.; SCHACHTMAN, D.P.; MAY, S.; SANDBERG, G.; BENFEY, P.; FRIML, J.; KERR, I.; BEECKMAN, T.; LAPLAZE, L.; BENNETT, M.J. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. **Nature Cell Biology**, London, v. 10, p. 946-954, 2008.

TAJIMA, Y.; IMAMURA, A.; KIBA T.; AMANO, Y.; YAMASHINO, T.; MIZUNO T. Comparative Studies on the Type-B Response Regulators Revealing their Distinctive Properties in the His-to-Asp Phosphorelay Signal Transduction of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 28-39, 2004.

TANAKA, F.A.O.; KITAJIMA, E.W. (Org.). **Curso Introdução de Microscopia Eletrônica de Varredura**. 2.ed. Piracicaba, 2009. 32p.

TIWARI, S.B.; WANG, X.J.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. AUX/IAA Proteins Are Active Repressors, and Their Stability and Activity Are Modulated by Auxin. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 2809–2822, 2001.

THIMANN, K.V.; SKOOG, F. Studies on the growth hormone of plants III. The inhibitory action of the growth substance on bud development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 19, p. 714-716, 1933.

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

VOLLBRECHT, E.; VEIT, B.; SINHA, N.; HAKE, S. The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. **Nature**, London, v. 350, p. 241-242, 1991.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHE´, A.; PECH, J-C.; BOUZAYEN, M. The Tomato Aux/IAA Transcription Factor IAA9 Is Involved in Fruit Development and Leaf Morphogenesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2676–2692, 2005.

YANAI, O.; SHANI, E.; DOLEZAL, K.; TARKOWSKI, P.; SABLowski, R.; SANDBERG, G.; SAMACH, A.; ORI, N. *Arabidopsis* KNOXI Proteins Activate Cytokinin Biosynthesis. **Current Biology**, Cambridge, v. 15, p. 1566-1571, 2005.

YANAI, O.; SHANI, E.; RUSS, D.; ORI, N. Gibberellin partly mediates LANCEOLATE activity in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 68, p. 571-578, 2011.

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

ZHAO, Z.; ANDERSEN, S.U.; LJUNG, K.; DOLEZAL, K.; MIOTK, A.; SCHULTHEISS, S.J.; LOHMANN, J.U. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. **Nature**, London, v.465, p.1089-1093, 2010