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

**Estudo da interação entre fitocromo e hormônios
vegetais no controle do desenvolvimento**

Rogério Falleiros Carvalho

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2007**

Rogério Falleiros Carvalho
Biólogo

**Estudo da interação entre fitocromo e hormônios
vegetais no controle do desenvolvimento**

Orientador:
Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

Piracicaba
2007

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

Carvalho, Rogério Falleiros

Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento / Rogério Falleiros Carvalho. -- Piracicaba, 2007.
106 p. : il.

Tese (Doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Desenvolvimento vegetal 2. Fitoquímica 3. Hormônios vegetais
4. Morfogênese vegetal 5. Mutação genética 6. Pigmentos vegetais
7. Tomate I. Título

CDD 635.642

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

Aos meus pais

Pérsio

&

Maria Amélia

Com todo meu amor

OFEREÇO

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

DEDICO

Agradecimentos

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado ao longo do tempo. Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável, além do pão, o trabalho e a ação. E, quando tudo mais faltasse, a você eu deixaria, se pudesse, um segredo, o de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída”. - *Mahatma Ghandi*

Àqueles que fizeram parte dessa jornada, mesmo que de forma indireta, quero agradecer incondicionalmente. São eles:

Professor Dr. Lázaro Peres, pela digna orientação, ensinamentos, amizade e paciência.

Professor Dr. Ricardo Kluge, pelos equipamentos laboratoriais utilizados e também pela amizade.

Professor Dr. Massanori Takaki, do Instituto de Biociências da Unesp Rio Claro, pelos ensinamentos e também pela amizade.

Professor Dr. Basso e sua equipe, Ademir, Alemão, Cometa e Thiago, pelos equipamentos laboratoriais utilizados e também pela amizade.

Professores Drs. do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Beatriz Appezzato, Luiz Antônio Gallo, Murilo Melo, Paulo de Castro e Ricardo Ferraz, pelo incentivo, ensinamentos e amizade.

Solizete, que além de ser uma excelente profissional, eu a agradeço pela sincera amizade ao longo de tantos anos.

Denise, que em tão pouco tempo creditou todos os seus sonhos aos meus “Te amo”.

Membros do Laboratório do Controle Hormonal do Desenvolvimento, Angélica, Clarissa, Lilian, Fernando, Guillermo, Juliana, Marcelo, Mariana, Simone, Tati, Rafael e Ricardo. Obrigado, pessoal. Serei eternamente grato pela presteza, confiança, paciência

e, sobretudo, a amizade.

Romeu e Miranda, pelo tempo dedicado ao desenvolvimento deste trabalho, e também, claro, pela sincera amizade.

Todos os alunos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por compartilhar os encantamentos que a ciência nos promove.

Também a Luciane, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade e bom humor constante.....valeu Lú.

Amigas indescritíveis, Carol”e”; Carol Vitti, Diu, Gi, Maitê e Táta por recheiar minha vida com a mais pura e sincera amizade. Amo muito vocês.

Flavinha, que além de mãe da Vitória, minha sobrinha linda, e esposa do Ademir “Finazzi” fez muito pelo PPG Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Moradores, ex-moradores e agregados da república Blue House; Ana, Boi, CPI, Carole (Xexe), Cal (*in memoriam*), Clô, Dani, Dênis (FDP), Douglas, Farol”e”, Fininho, Gi, Hernesto (*in memoriam*), Maicon, Minimi, Morruga, Nei, Pelé, Presidente, Ricardinho, Sandal”e”, Serjão, Severino, Simão, por tornar minha passagem por Piracicaba mais do que uma questão profissional, permitir que eu fizesse parte desta família.

Pessoal do futebol.....não vou citar nomes pois foram muitos que passaram pelo gramado do Parque “São Jorge” durante esses anos rss.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelos recursos concedidos para a realização do trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	16
2 OBTENÇÃO DE MUTANTES FOTOMORFOGENÉTICOS E HORMONAIS EM UMA ÚNICA CULTIVAR DE TOMATEIRO (<i>Lycopersicon esculentum</i> MILL. CV MICRO-TOM): UM MODELO PARA ESTUDAR O CONTROLE MULTIFATORIAL DO DESENVOLVIMENTO	18
Resumo	18
Abstract.....	19
2.1 Introdução.....	20
2.2 Desenvolvimento.....	23
2.2.1 Material e Métodos	23
2.2.1.1 Cultivo e cruzamentos	23
2.2.1.2 Tratamento com luz.....	26
2.2.1.3 Análises do desenvolvimento vegetativo	26
2.2.1.4 Área de células epidérmicas	27
2.2.1.5 Aspectos reprodutivos	27
2.2.1.6 Análise estatística	27
2.2.2 Resultados e Discussão	28
2.2.2.1 Obtenção e observação de fenótipo recombinante de mutações hormonais e fotomorfofenéticas no background Micro-Tom.....	28
2.2.2.2 Efeito das mutações hormonais e fotomorfofenéticas na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de Micro-Tom na luz e no escuro	34
2.2.2.2.1 Germinação de sementes	34
2.2.2.2.2 Alongamento do hipocótilo	35
2.2.2.2.3 Alongamento da raiz	36

2.2.2.3 Efeito das mutações hormonais e fotomorfológicas no crescimento vegetativo de plantas adultas de Micro-Tom crescidas em casa de vegetação.....	40
2.2.2.3.1 Altura do caule principal e matéria seca de caules e raízes.....	40
2.2.2.3.2 Dominância apical.....	41
2.2.2.3.3 Área foliar e de células epidérmicas.....	44
2.2.2.4 Efeito das mutações hormonais e fotomorfológicas no crescimento reprodutivo de plantas adultas de Micro-Tom crescidas em casa de vegetação.....	46
2.2.2.5 Limitações e novas perspectivas para o uso de MT como modelo.....	50
2.3 Conclusão.....	53
Referências.....	53
3 ALONGAMENTO E ACÚMULO DE ANTOCIANINAS EM HIPOCÓTILOS DE TOMATEIRO COMO UMA RESPOSTA HORMONAL E/OU FOTOMORFOGENÉTICA. ESTUDOS COM MUTANTES E DUPLOS MUTANTES EM CINCO CLASSES HORMONAIIS E FITOCROMO	66
Resumo	66
Abstract.....	68
3.1 Introdução.....	69
3.2 Desenvolvimento.....	71
3.2.1 Material e Métodos	71
3.2.1.1 Material vegetal	71
3.2.1.2 Cultivo e construção de duplos mutantes	71
3.2.1.3 Determinação de antocianinas e medidas do comprimento do hipocótilo	72
3.2.1.4 Tratamentos com luz.....	72
3.2.2 Resultados	72
3.2.2.1 Obtenção e fenótipo dos duplos mutantes hormonais-fotomorfológicos.....	72
3.2.2.2 Acúmulo de antocianinas em mutantes hormonais.....	75
3.2.2.3 Acúmulo de antocianinas em mutantes fotomorfológicos na presença de hormônios exógenos	77

3.2.2.4 Interação entre luz e hormônios no acúmulo de antocianinas	81
3.2.2.5 Alongamento do hipocótilo dos mutantes fotomorfogenéticos na presença de hormônios exógenos	82
3.2.2.6 Alongamento do hipocótilo de mutantes fotomorfogenéticos, hormonais e duplos mutantes	85
3.2.3 Discussão	89
3.2.3.1 CK e ABA promovem e GA inibe o acúmulo de antocianinas em hipocótilos de tomateiro.....	89
3.2.3.2 Controle hormonal do alongamento do hipocótilo de tomateiro na luz e escuro.....	91
3.2.3.3 AUX, ET, GA e ABA possuem vias distintas de phy no controle do acúmulo de antocianinas e alongamento do hipocótilo de tomateiro enquanto phy e CK podem partilhar uma mesma via nessas respostas	93
3.3 Conclusão	96
Referências.....	96

RESUMO

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE FITOCROMO E HORMÔNIOS VEGETAIS NO CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO

Muitas respostas moduladas pela luz durante o desenvolvimento das plantas também são reguladas por hormônios vegetais, levando à hipótese da interação entre ambos os fatores. Uma ferramenta valiosa para testar tal interação seria o uso de mutantes fotomorfogenéticos e hormonais, bem como duplos mutantes combinando ambos. Em tomateiro, embora sejam disponíveis mutantes com alterações na biossíntese de fotorreceptores e/ou na transdução do sinal da luz, bem como mutantes no metabolismo e/ou sensibilidade hormonal, esses estão presentes em cultivares diferentes, o que pode limitar seu uso de modo integrado e a construção de duplos mutantes. No presente trabalho, foram introgrididas em uma única cultivar de tomateiro, Micro-Tom (cv. MT), dezenove mutações afetando a biossíntese ou a resposta a fitocromo, bem como aos hormônios auxina (AUX), citocinina (CK), giberelina (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) e brassinoesteróides (BR). Tomando-se vantagem de tal coleção, duas respostas notadamente controladas tanto pela luz quanto por hormônios foram estudadas: alongamento e acúmulo de antocianinas em hipocótilos. Para tal, foram utilizadas as seguintes abordagens: i) tratamentos exógenos de diferentes classes hormonais em mutantes fotomorfogenéticos, ii) observação de hipocótilos de mutantes hormonais crescidos na luz e no escuro, iii) observação de duplos mutantes combinando mutações hormonais e fotomorfogenéticas. Assim, o acúmulo de antocianinas foi promovido pela CK e ABA e inibido pela GA, concordando com a redução no mutante deficiente em ABA (*notabilis* ou *not*) e no mutante hipersensível à GA (*procera* ou *pro*). Apesar do mutante com baixa sensibilidade à AUX (*diageotropica* ou *dgt*) acumular exageradamente antocianinas, a aplicação exógena não evidenciou o papel da AUX, sendo, porém, coerente com a sugestão de que esse mutante possui um balanço AUX/CK voltado para CK. Tanto a aplicação exógena quanto a avaliação nos mutantes *epinastic* (*epi*), super produção de ET, e *Never ripe* (*Nr*), baixa sensibilidade ao ET, sugerem uma função limitada desse hormônio na biossíntese de antocianinas. Na luz e no escuro, AUX, CK, ABA e ET exógenos resultaram na inibição do alongamento do hipocótilo, sendo coerente com a promoção em *dgt* (luz), promoção em *sit* (luz), inibição em *epi* (luz e escuro). Por outro lado, GA promoveu o alongamento corroborando a promoção em *pro*. Contrariando o efeito exógeno da CK, *brt* reduziu o alongamento na luz e no escuro. No escuro, o único mutante que apresentou alongamento do hipocótilo superior a MT foi o mutante deficiente na biossíntese do phy (*aurea* ou *au*). A utilização de duplos mutantes combinando phy e alterações hormonais mostrou uma interação aditiva (*au epi*, *au Nr*, *au dgt* e *au sit*), sinérgica (*au pro*) e epinástica (*au brt*) no acúmulo de antocianinas e alongamento do hipocótilo na luz, porém nessa última resposta, *au dgt* e *au sit* indicaram uma interação sinérgica. Juntos, esses resultados indicam que, embora phy possui vias distintas da AUX, ET, ABA e GA no controle do acúmulo de antocianinas e

alongamento do hipocótilo, parece que esse fotorreceptor partilha vias comuns com CK em ambas as respostas.

Palavras-chave: Cultivar Micro-Tom; Mutantes; Fitocromo; Hormônios; Alongamento do hipocótilo; Acúmulo de antocianinas.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE INTERACTIONS BETWEEN PHYTOCHROME AND PLANT HORMONES IN PLANT DEVELOPMENT

Many responses regulated by light during plant development are also regulated by plant hormones, suggesting an interaction between these factors. One important approach to test this hypothesis is the use of photomorphogenic and hormonal mutants and double mutant analysis. Mutants with altered photoreceptor biosynthesis, light signal transduction, hormonal metabolism and hormonal sensitivity are available in tomato. However, since they are in different cultivars, this can be a limitation for their use in a comprehensive study, as well as, for the construction of double mutants. In this work we performed the introgression of nineteen mutations in a single cultivar of tomato, Micro-Tom (cv. MT). These mutations affect biosynthesis or response to phytochrome (phy), auxin (AUX), cytokinin (CK), gibberellin (GA), abscisic acid (ABA), ethylene (ET) and brassinosteroid (BR). Using this collection of hormone mutants, we studied two responses which are controlled by light and hormones: elongation and anthocyanin accumulation in hypocotyls. For this purpose, we used three approaches: i) hormonal treatment in the photomorphogenic mutants, ii) measurement of hypocotyl lengths from hormonal mutants grown under light and dark conditions and iii) double mutant (photomorphogenic-hormonal) analysis. Anthocyanin accumulation was promoted by CK and ABA and inhibited by GA. This is in accordance with the reduction of anthocyanin accumulation in the ABA deficient mutant (*not*) and in the GA hypersensitive mutant (*pro*). Although the *diageotropica* (*dgt*), auxin-insensitive mutant, showed a high anthocyanin accumulation, the addition of auxin did not supported a role for this hormone in anthocyanin accumulation. On the other hand, this could be due to a low auxin-to-cytokinin ratio presented by *dgt*. Data from mutants with altered metabolism and sensitivity of ethylene, *epinastic* (*epi*) and *Never ripe* (*Nr*) respectively, and from plants treated with this hormone suggest a limited role of ethylene in the anthocyanin biosynthesis. Exogenous AUX, CK, ABA and ET inhibited the hypocotyl elongation. This is coherent with the promotion of hypocotyl elongation in *dgt* and *sit* mutants under light conditions and inhibition of hypocotyl elongation in the *epi* mutant in the light and dark. On the other hand, GA promoted the hypocotyl elongation corroborating the same effect seen in *pro*. The *brt* mutant showed a reduced hypocotyl elongation in light and dark conditions, which contradicts the effect of exogenous cytokinin. The phytochrome-deficient *aurea* (*au*) mutant was the only one to show an enhanced hypocotyl elongation in the dark compared to the wild type (MT). The combination between photomorphogenic and hormonal mutants (double mutants) showed additive (*au epi*, *au Nr*, *au dgt e au sit*), synergistic (*au pro*) and epistatic (*au brt*) interactions considering the anthocyanin accumulation and hypocotyl elongation. Synergistic interaction was observed in the elongation hypocotyl of the *au dgt* and *au sit* double mutants. These results indicate that phy and CK may share some signaling/metabolic pathways in the control of anthocyanin accumulation and hypocotyl elongation. On the other hand, our data do not support an

interaction between phy and the hormones AUX, ET, ABA and GA in the control of hypocotyls elongation or anthocyanin accumulation.

Keywords: cultivar Micro-Tom, mutants, phytochrome, hormones, hypocotyl elongation, anthocyanin accumulation.

1 Introdução

Desde a germinação até a frutificação, a luz percebida por diferentes fotorreceptores controla o desenvolvimento vegetal de maneira dependente de sua intensidade e qualidade (NEFF et al., 1999). Dessa forma, numerosos trabalhos têm avaliado a atividade de fotorreceptores em diferentes processos desenvolvimentais, tais como a germinação de sementes, inibição do alongamento dos caules, acúmulo de pigmentos e reservas bem como indução floral (MANCINELLI; BORTHWICK; HENDRICKS, 1966; MANCINELLI; RABINO, 1975; CASAL; WHITELAM; SMITH, 1990; IZAWA et al., 2002; BOCCALANDRO et al., 2003). Existem pelo menos três sistemas de fotorreceptores: fitocromos, os quais absorvem predominantemente o comprimento de onda do vermelho (V) e vermelho-extremo (VE), fotorreceptores que absorvem a luz azul (criptocromos e fototropinas) / UV-A (criptocromos) e aqueles que absorvem o UV-B. Desses, os fitocromos, os quais são mais bem caracterizados, existem em duas formas foto-interconvertíveis, uma que absorve o V (phyv) e torna-se uma molécula ativa (phyve), e outra que absorve VE (phyve), revertendo-se a uma forma inativa (phyv). O processo de reversão de inativo para ativo se dá também pela absorção do azul, porém menos efetivamente. Além disso, phyve pode ser revertido a phyv em condição de escuro (Figura 1) (Kendrick & Kronenberg 1994).

Os fitocromos consistem em um polipeptídio (apoproteína) carregando um cromóforo, a fitocromobilina, a qual é um tetrapirrol linear. A reação de conversão da forma inativa de fitocromo (phyv) em forma ativa (phyve) é uma reação de isomerização. Desse modo, a absorção do vermelho pelo phyv resulta na mudança do anel D da forma cis (inativa) para forma trans (ativa) característica do phyve. Mudanças na propriedade protéica também contribuem para a alteração entre as duas formas do fitocromo (LAGARIAS; LAGARIAS, 1989). Em *Arabidopsis*, há diferentes tipos de apoproteínas codificadas por uma família gênica, *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, que formam as apoproteínas *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, as quais, após se ligarem ao cromóforo, formam os fitocromos phyA, phyB, phyC, phyD e phyE, respectivamente. Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) também foram encontrados cinco genes para apoproteínas *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF* (PRATT et al., 1997).

Efeitos similares à atividade da luz em várias etapas do desenvolvimento podem ser observados devido à ação das cinco principais classes hormonais: auxina (AUX), citocinina (CK), giberelina (GA), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET). De fato, por longa data se sabe que hormônios controlam a germinação (principalmente ABA e GA), alongamento dos caules (principalmente AUX e GA), acúmulo de pigmentos e reservas (CK, GA e ABA), e indução floral (GA, CK e ET, dependendo da espécie vegetal) (JONES, 1987; DEIKMAN; HAMMER, 1995; JENSEN; HANGARTER; ESTELLE, 1998; FELLNER et al., 2001; SEO et al., 2006). Essa constatação levanta a questão de que os hormônios vegetais poderiam fazer parte da via de transdução de sinal da luz na fotomorfogênese (NEMHAUSER; CHORY, 2004). Uma maneira de se testar tal hipótese seria através do uso de mutantes com alterações tanto no fitocromo quanto em diferentes classes hormonais (Figura 1). A observação de mutantes hormonais em diferentes condições luminosas e de mutantes fotomorfogénéticos sob o efeito exógeno das várias classes hormonais, bem como combinações de duplos mutantes fotomorfogénéticos-hormonais, permitiriam então estabelecer se uma determinada classe hormonal afeta um processo fotomorfogénético e se esse efeito envolve a interação com fotorreceptores.

Figura 1 – Hipótese para um controle de eventos fotomorfogênicos (ex. alongamento e acúmulo de antocianinas em hipocótilos) em tomateiro pelo fitocromo ativo e por diferentes classes hormonais. Os mutantes *fri* e *tri* são defeituosos para a fabricação de apoproteínas PHYA e PHYB1, respectivamente. As mutações *au* e *yg-2* possuem alterações na via de biossíntese do cromóforo. Apesar dos genes necessários para biossíntese do cromóforo estarem no núcleo, sua molécula é montada nos plastídios. As alterações fotomorfogênicas nos mutantes *lp*, *hp1*, *dg* (*hp2*) e *atv* ocorrem na via de transdução de sinal do fitocromo. Enquanto as mutações *lp*, *hp1*, *hp2* e *atv* levam a uma maior inibição do alongamento e promoção do acúmulo de antocianinas nos hipocótilos, as mutações *au*, *yg2* produzem o fenótipo inverso, mesmo em plântulas crescidas na luz. Os hormônios também possuem um forte controle desses processos. A giberelina (GA) é considerada um promotor do alongamento na luz e inibidora do acúmulo de antocianina. A auxina (AUX) possui efeito semelhante ao de GA, estimulando o alongamento do hipocótilo, porém no escuro. O etileno (ET) inibe o alongamento do hipocótilo tanto no claro quanto no escuro. O ácido abscísico (ABA) e a citocinina (CK) são considerados promotores do acúmulo de antocianinas. Os mutantes *dgt*, *bnt* e *Nr* são pouco sensíveis aos hormônios AUX, CK e ET, respectivamente. O mutante *pro* é supersensível a GA e o mutante *epi* é super produtor de ET. Os mutantes *sit* e *gib* são deficientes em ABA e GA, respectivamente. (Parte desse esquema foi adaptada de Kendrick et al., 1997)

Para um estudo amplo empregando a abordagem proposta acima, seriam necessários não só mutantes em diferentes classes hormonais e fotomorfogenéticos, mas a presença de todos eles em um só background genético (e.g. uma única cultivar). No presente trabalho, adotamos o tomateiro como modelo genético e utilizando uma cultivar de porte reduzido e ciclo rápido (cv Micro-Tom) obtivemos dezenove mutantes hormonais e fotomorfogenéticos em um só background genético (linhagens quase isogênicas). Tanto a obtenção dessa coleção, quanto o teste se a mesma é adequada para estudos desenvolvimentais, são apresentados no Capítulo 1. De posse de tal coleção, no Capítulo 2 foi analisado a interação entre luz e hormônios vegetais utilizando duas respostas bastante influenciadas por esses fatores, o alongamento do hipocótilo e o acúmulo de antocianinas nesses. Para tal, foram utilizados não só estudos extensivos em cada classe de mutantes, bem como combinações de duplos mutantes fotomorfogenéticos-hormonais.

Referências

BOCCALANDRO, H.; PLOCHUK, E.; YANOVSKY, M.; GATZ, C.; SÁNCHEZ, R.; CASAL, J. Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, p. 1-8, 2003.

CASAL, J.J.; WHITELAM, G.C.; SMITH, H. Phytochrome effects on the relationship between chlorophyll and steady-state levels of thylakoid polypeptides in light-grown tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 370-374, 1990.

DEIKMAN, J.; HAMMER P. E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 47-57, 1995.

FELLNER, M.; ZHANG, R.; PHARIS, R. P.; SAWHNEY, V. K. Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. **Journal of Experimental Botany**, Oxford. v. 52, p. 725-738, 2001.

IZAWA, T.; OIKAWA, T.; SUGIYAMA, N.; TANISAKA, T.; YANO, M.; SHIMAMOTO, K. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. **Genes and Development**, New York, v. 16, p. 2006–2020, 2002.

JENSEN, P.J.; HANGARTER, R.P.; ESTELLE, M. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 455–462, 1998.

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

KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. (Eds.): Photomorphogenesis in Plants - 2nd Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 828 (1994).

KENDRICK, R.E.; KERCKHOFFS, L.H.; VAN TUINEN, A.; KOORNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Plant, Cell Environment**, Oxford, v. 20, p. 746–751, 1997.

LAGARIAS, J.C.; LAGARIAS, D.M. Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 86, p. 5778–5780, 1989.

MANCINELLI, A.L.; BORTHWICK, H.A.; HENDRICKS, S.B. Phytochrome action in tomato-seed germination. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 127, p. 1–5, 1966.

MANCINELLI, A.L.; RABINO, I. Photocontrol of anthocyanin synthesis. IV. Dose dependence and reciprocity relationship. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, p. 351–355, 1975.

NEFF, M.M.; NGUYEN, S.M.; MALANCHARUVIL, E.J.; FUJIOKA, S.; NOGUCHI, T.; SETO H.; TSUBUKI, M.; HONDA, T.; TAKATSUTO, S.; YOSHIDA, S.; CHORY, J. BAS1: a gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 96, p. 15316–15323, 1999.

NEMHAUSER, J.; J. CHORY. BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 55, n. 395, p. 265–270, 2004.

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

SEO, M.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; ENDO, A.; OKAMOTO, M.; YAMAUCHI, Y.; NORTH, H.; MARION-POLL, A.; SUN, T.P.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: Phytochrome-regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid-regulation of gibberellin metabolism. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 354–366, 2006.

2 OBTENÇÃO DE MUTANTES FOTOMORFOGENÉTICOS E HORMONAIS EM UMA ÚNICA CULTIVAR DE TOMATEIRO (*Lycopersicon esculentum* MILL. CV MICRO-TOM): UM MODELO PARA ESTUDAR O CONTROLE MULTIFATORIAL DO DESENVOLVIMENTO

Resumo

Mutantes hormonais e em moléculas receptoras/transdutoras de sinais ambientais têm se tornado uma ferramenta útil para estudos integrados do desenvolvimento e sua interação com o ambiente. Tal abordagem exige que as mutações investigadas estejam em um mesmo background genético, para que comparações e combinações entre elas sejam feitas. No presente estudo, dezenove mutações afetando a biossíntese ou a resposta aos hormônios auxina (AUX), citocinina (CK), giberelina (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) e brassinoesteróides (BR) e ao fitocromo foram colocadas em um único background genético de tomateiro, cv Micro-Tom (MT), que possui algumas das vantagens do modelo *Arabidopsis*, ou seja, porte reduzido e ciclo de vida curto. Apesar do porte reduzido de MT ser em parte devido à mutação *dwarf*, que reduz a biossíntese de BR, mutações afetando a biossíntese ou sensibilidade a esse hormônio (*cu3* e *dpy*), bem como a GA (*gib1*, *gib2*, *gib3* e *pro*) apresentaram fenótipo aditivo no background MT. Essas observações evidenciam que nem BR e nem GA explicam totalmente o tamanho miniatura de MT e que alterações nessas e em outras classes hormonais podem ser estudadas no background MT, o qual passa a ser considerado “wild type”. O pequeno tamanho e a deficiência de BR em MT também não impediram que essa cultivar estiolasse no escuro e que mutantes deficientes em fitocromo (*au* e *yg2*) mostrassem a resposta descrita anteriormente para outras cultivares, ou seja, aspecto estiolado mesmo na luz. Desse modo, vários aspectos do desenvolvimento vegetativo (germinação e alongamento do hipocótilo na luz e no escuro, além de crescimento de plantas adultas) e reprodutivo (floração, frutificação e amadurecimento) foram estudados. Os mutantes no background MT mostraram respostas coerentes com os efeitos esperados para cada classe hormonal ou alteração no fitocromo. Além disso, a facilidade de manipulação de MT nos permitiu observar fenótipos que sugerem efeitos gênicos ainda não descritos para algumas classes hormonais ou mutações estudadas. Entre as novas respostas observadas, algumas são de interesse direto para o melhoramento de tomateiro, como o aumento do número de flores na inflorescência do mutante com deficiência em fitocromo, no peso do fruto no mutante superprodutor de ET e no teor de sólidos solúveis no mutante supersensível a GA.

Palavras-chave: Cultivar Micro-Tom; Mutantes; Modelo de estudo; Fotomorfogênese; Hormônios.

2 HORMONE AND PHYTOCHROME MUTANTS IN A SINGLE TOMATO GENETIC BACKGROUND (*Lycopersicon esculentum* MILL. CV MICRO-TOM): A MODEL TO STUDY THE ENDOGENOUS CONTROL OF PLANT DEVELOPMENT.

Abstract

Mutants related to hormone or other receptor/signaling molecules (such as phytochrome) are a powerful tool to study the integration of environmental and endogenous signals in the control of plant development. A crucial yet often overlooked aspect of this approach is the use of mutants in a single genetic background to allow for comparisons between each mutant and multiple mutant combinations against a single wild type/control. In this work, 19 different mutations affecting either biosynthesis or signaling in phytochrome, auxin (AUX), cytokinin (CK), gibberellin (GA), abscisic acid (ABA), ethylene (ET) and brassinosteroid (BR), were introgressed (through successive backcrosses) into the tomato miniature cultivar Micro-Tom (MT). MT presents some of the advantages of *Arabidopsis*, such as reduced size and short life cycle. In spite of the miniature habit of MT being partly due to a reduced BR content conferred by the *dwarf* mutation, other mutations affecting biosynthesis or sensitivity to BR (*cu3* and *dumpy*) and GA (*gib1*, *gib2*, *gib3* and *pro*) showed an additive phenotype in the MT background. This suggests that neither BR nor GA can fully account for the small size of this cultivar, which thus can be considered the true control (wild type) in studies involving these and other hormone classes. Moreover, MT's small size did not preclude it from etiolating when grown in the dark, and phytochrome deficient mutants (*au* and *yg2*) in this background showed the characteristic etiolation response when grown in normal light. In the same fashion, many aspects of vegetative and reproductive development were studied and the different mutants showed responses coherent with the expected and known effects of the respective hormone classes. These results prove that the developmental alterations already present in MT (e. g. dwarfism) are not a drawback to study plant development. Furthermore, a series of hitherto unknown phenotypes were observed for some of the mutations and are described here. Among these, some are of direct interest for tomato breeding, such as increased number of flowers per inflorescence, increased fleshy fruit weight and increased soluble solids content. Besides the study of developmental processes not present in *Arabidopsis*, especially those linked to tomato breeding, we also propose the use of the mutant collection presented here as an inexpensive didactical tool for plant physiology.

Keywords: Cultivar Micro-Tom; Mutants; Study model; Photomorphogenesis; Hormones.

2.1 Introdução

O desenvolvimento vegetal é regulado pela interação de fatores ambientais e endógenos (e.g. hormônios). A luz, um dos principais moduladores externos do desenvolvimento (CHORY et al., 1996; NEFF et al., 2000), pode interagir com hormônios em várias respostas, tais como germinação (KUCERA; CHON; LEUBNER-METZGER, 2005), alongamento caulinar (VANDENBUSSCHE et al., 2005), dominância apical (KEBROM; BURSON; FINLAYSON, 2006), florescimento (OKAMURO et al., 1997) e senescência (QUILES; CUELLO; SABATER, 1990). Considerando-se a existência de pelo menos seis classes hormonais com forte impacto no desenvolvimento, e que interagem entre si; auxina (AUX), citocinina (CK), giberelina (GA), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) e brassinoesteróide (BR), bem como a gama de fatores ambientais que podem afetar uma planta, pode se vislumbrar a complexidade das interações ambiente-hormônios-desenvolvimento.

O uso de mutantes na fisiologia vegetal (KOORNNEEF; ALONSO-BLANCO; PEETERS, 1997) é uma alternativa simples para abordar questões complexas, como o estudo do controle multifatorial do desenvolvimento. O modelo vegetal onde mutantes são mais conhecidos é *Arabidopsis thaliana*, embora também existam representantes em espécies de interesse agrônômico direto como o arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.) e tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L.). O tomateiro é talvez uma das espécies de importância econômica em que se conhece o maior número de mutantes e variações genéticas naturais (STEVENS; RICK, 1986). Essa espécie constitui-se também em um modelo complementar, já que, além do interesse agrônômico, possui uma série de características desenvolvimentais não presentes em *Arabidopsis*, tais como ausência de crescimento em roseta, florescimento simpodial e independente do fotoperíodo, bem como a presença de frutos carnosos e climatéricos.

Já foram descritos em tomateiro mutantes afetando o metabolismo e/ou sensibilidade à auxina (HICKS; RAYLE; LOMAX, 1989; KELLY; BRADFORD, 1986; OH et al., 2006), citocinina (PINO-NUNES, 2005), ácido abscísico (TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000; BURBIDGE et al., 1999), giberelinas (JONES 1987; BENSEN; ZEEVAART, 1990; KOORNNEEF et al., 1990), etileno (FUJINO et al., 1988;

WILKINSON et al., 1995), brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999; KOKA et al., 2000; MONTROYA et al., 2002) e ácido jasmônico (HOWE et al 1996; HOWE; RYAN, 1999; LI; LI; HOWE, 2001), além de vários mutantes fotomorfogênicos (KENDRICK et al., 1997). A função gênica de muitas dessas mutações hormonais e fotomorfogênicas já é conhecida (Tabelas 1 e 2) e há a perspectiva de um incremento nessas descobertas já que o genoma dessa solanácea está sendo sequenciado por um consórcio entre 10 países (MUELLER et al. 2005).

A análise funcional das mutações é altamente dependente da influência do genoma em que está inserida, sendo que a validade das conclusões destes estudos pode ser comprometida pela comparação entre mutantes em background genéticos distintos. A exemplo disso, mutantes hormonais e fotomorfogênicos que se conhecem hoje em tomateiro estão presentes em diferentes cultivares (Tabelas 1 e 2), além de alguns genótipos os quais representam mutações (*cu3*) ou variações genéticas naturais (*lp* e *atv*) descobertas em espécies selvagens e cujo processo de introgressão (retrocruzamentos sucessivos) no tomateiro cultivado permanece incompleto. Uma das alternativas para se colocar todas essas mutações em um mesmo background genético seria sua introgressão em uma só cultivar, tal qual foi realizado para algumas mutações na cv Ailsa Craig (MAXON-SMITH; RICHIE, 1982). Alternativamente, mutagênese em larga escala de uma só cultivar, como por exemplo M82 (MENDA et al., 2004), também poderá gerar alelos das mutações aqui consideradas, embora tais alelos possam ter efeitos diferentes daqueles já bem descritos na literatura.

Um outro fator limitante para o uso extensivo de mutações em tomateiro é o fato do seu porte e ciclo de vida não permitirem o cultivo em condições de estrutura mínima, como se consegue com *Arabidopsis*. Uma alternativa para isso tem sido a cv Micro-Tom (MT), uma planta ornamental de porte muito reduzido (SCOTT; HARBAUGH, 1989), capaz de completar seu ciclo em apenas 70-90 dias, sendo cultivada em vasos com capacidade menor que 100 mL de substrato. Desde a proposta dessa cultivar como modelo genético por Meissner et al., 1997, ela vem sendo utilizado em um número crescente de estudos genético-fisiológicos (DAVID-SCHWARTZ et al., 2001; LI; LI; HOWE, 2001; TIEMAN et al., 2001; ISAACSON et al., 2002; VOGG et al., 2004; WANG et al., 2005; SERRANI et al., 2007a; SERRANI et al., 2007b). A principal abordagem

utilizada em tais estudos tem sido a mutagênese e a transformação genética (MEISSNER et al., 1997; MEISSNER et al., 2000; EMMANUEL; LEVY, 2002; LIU; SCHIFF; DINESH-KUMAR, 2002; MATHEWS et al., 2003; WATANABE et al., 2007; MATSUKURA et al., 2007). Desse modo, há hoje coleções de mutantes e plantas transgênicas em MT (MEISSNER et al., 1997; MATHEWS et al., 2003; WATANABE et al., 2007), além de bibliotecas de ESTs terem sido construídas para essa cultivar (YAMAMOTO et al., 2005).

Embora as mutações induzidas em MT sejam úteis para estudos genômicos (EMMANUEL; LEVY, 2002), elas possuem a desvantagem de carecerem de informações quanto ao efeito e a função gênica dos possíveis novos mutantes hormonais ou fotomorfogenéticos que por ventura tenham sido obtidos. Além disso, para aqueles genes onde MT já possui alelos nulos, a mutagênese não gerará variações, sendo essas somente conseguidas se forem introgridas variações naturais vindas de outras cultivares ou espécies selvagens, tal qual proposto para *Arabidopsis* (ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF, 2000).

No presente estudo, dezenove mutações e variações naturais afetando a biossíntese ou resposta a fitocromo e a seis classes hormonais foram introgridas no background MT para um estudo do controle hormonal múltiplo de várias respostas desenvolvimentais. Apesar de MT possuir algumas mutações que podem interferir no estudo do desenvolvimento (MEISSNER et al., 1997; LIMA et al., 2004; MARTÍ et al., 2006), tais como *dwarf* (*d*), que reduz a biossíntese de BR (BISHOP et al., 1999), e *selfpruning* (*sp*) que controla o padrão de florescimento (PNUELI et al., 1998), todas as respostas desenvolvimentais estudadas foram coerentes com os efeitos esperados para cada classe hormonal ou fotomorfogenética. Além disso, a facilidade de manipulação de MT nos permitiu observar fenótipos que sugerem efeitos gênicos ainda não descritos para algumas classes hormonais ou mutações estudadas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Cultivo e cruzamentos

O cultivo de plantas adultas tanto para realização de cruzamentos quanto para avaliar crescimento vegetativo (Figuras 4, 6, 7 e 8) e reprodutivo (Tabela 3) foi realizado em uma casa de vegetação com irrigação automática (4 vezes ao dia), temperatura média anual de 28 °C, fotoperíodo de 11,5 h (inverno) e 13 h (verão) e radiação de 250 a 350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR, conseguido através da diminuição da radiação natural com o uso de malha refletora 50%. Sementes dos mutantes hormonais e fotomorfo genéticos foram semeadas em bandejas contendo uma mistura na proporção de 1:1 de substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex) com vermiculita expandida, suplementado com 1g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Após 10 dias, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade para 150 mL (Micro-Tom), ou para 10 L (mutantes parentais), com as mesmas misturas para substrato. Após os cruzamentos entre os mutantes parentais e a cv MT e obtenção de porte micro em gerações posteriores, os mutantes também foram transplantados para vasos com capacidade para 150 mL. Em cada cruzamento os frutos maduros foram colhidos e a polpa contendo as sementes foi fermentada durante 12 horas adicionando-se um pouco de água e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) liofilizada, utilizada para panificação (Fermix). Posteriormente, as sementes foram lavadas e secas em ambiente ventilado e sombreado.

O processo de introgressão de uma mutação ou variação natural usando um parental recorrente (cv Micro-Tom) consiste em uma série de cruzamentos e retrocruzamentos (Figura 1). Em cada cruzamento, pólenes foram retirados dos mutantes parentais e postos para polinizar flores emasculadas de MT. O primeiro cruzamento entre MT e os mutantes produziu plantas F1. A partir desta geração, permitiu-se que houvesse autofecundação para obtenção de plantas F2, na qual houve a primeira seleção para porte pequeno e presença de mutações. Após a seleção, houve retrocruzamento com MT até a sexta geração (BC6), permitindo a cada duas gerações que houvesse autofecundação para serem visualizados as mutações em homozigose. Após alcançar a geração BC6F2, os genótipos foram considerados linhagens quase

isogênicas (REID, 1993). Para mutantes dominantes, como *Nr*, a autofecundação não foi necessária entre os cruzamentos, mas testes de progênie foram realizados em BC6F2 para identificar plantas homozigotas. Além disso, frutos de *Nr* foram colhidos antes da maturação completa, já que a pouca sensibilidade ao etileno não permite que o fruto amadureça completamente. Também de maneira precoce foram colhidos os frutos dos mutantes deficientes na biossíntese de ABA (*sit*, *flc* e *not*) para evitar a germinação no interior dos frutos maduros. Mutantes deficientes na biossíntese de GA (*gib1*, *2* e *3*) não germinam na ausência desse hormônio exógeno. Portanto, para seleção deste genótipo, inicialmente as sementes foram postas para germinar em papel umedecido com água, sendo descartadas as que germinaram primeiro. As sementes restantes foram tratadas com GA (100 μ M) e as que germinaram foram aclimatadas em casa de vegetação, sendo o fenótipo deficiente em GA observado após o término do efeito residual dessa substância. Após a observação do fenótipo, os mutantes voltaram a ser tratados com 100 μ M de GA a cada 15 dias para facilitar a produção de flores e desenvolvimento dos frutos (KOORNNEEF et al., 1990).

Figura 1 - Representação esquemática do processo de introgressão. Mutantes hormonais, como representado aqui por *notabilis* (*not*), foram introgrididos no background Micro-Tom (MT) através de seis retrocruzamentos (BCs) e autopolinizações (BCnF2). (1) Porcentagem teórica do genoma de MT em cada geração. (2) Tempo em meses para alcançar cada geração. (3) Nomenclatura de cada geração representando cruzamentos e retrocruzamentos (F1 e BCn) e autopolinizações (F2, BCnF2). As autopolinizações foram necessárias para visualização do fenótipo de mutações recessivas (ex. *not*), sendo que o processo de introgressão tem duração teórica de 29 meses. No caso de mutantes dominantes (ex. *Nr*) o processo de introgressão tem duração teórica de 24 meses. Em F2, sementes foram semeadas em alta densidade e plântulas com 14 dias de idade foram selecionadas para porte MT, sendo a proporção de 1:27 (3,5%). Nas plantas resultantes, selecionou-se aquelas com tendência ao murchamento (*not/not*) e posteriormente aquelas com crescimento determinado (*sp/sp*), sendo a proporção 1:3 (25%) em cada triagem. Desse modo, a proporção final de plantas selecionadas em F2 é de 1:47 (0,2%). Nos BCs subsequentes, o porte anão e o crescimento determinado ficaram fixados, não havendo mais necessidade de seleção, já que o parental recorrente (MT) também tem essas características. Desse modo, no resto do processo de introgressão bastou selecionar *not* em BC2F2, BC4F2 e BC6F2, sendo a proporção de 1:7 (12,5%)

2.2.1.2 Tratamento com luz

Para avaliar o tempo de germinação, o comprimento do hipocótilo e raiz em condições de escuro, sementes foram postas em caixas plástica pretas (gerbox) contendo papel de filtro umedecido com água destilada. O tempo de germinação foi avaliado durante cinco dias utilizando-se 3 repetições de 50 sementes. A contagem foi realizada em uma sala escura com luz verde de segurança. Foram consideradas germinadas sementes que apresentaram a protrusão da radícula. O comprimento do hipocótilo e da raiz foi medido após 10 dias em 20 plântulas de cada genótipo. Para tratamentos com luz, a germinação de sementes foi avaliada em incubadora para B.O.D. Para o comprimento do hipocótilo e raiz, plântulas foram crescidas em uma sala de crescimento utilizada para cultivo de plantas *in vitro*. Tanto na B.O.D quanto na sala de crescimento, as condições ambientais foram mantidas em torno de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas ($55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR).

2.2.1.3 Análises do desenvolvimento vegetativo

Durante 56 dias foi medida, em intervalos de 7 dias, a altura das plantas com uma régua, sendo considerada a base da planta até o ápice. A matéria seca da raiz e do caule foi pesada em plantas com 60 dias, após serem postas para secar a 60 °C durante 7 dias em uma estufa. O índice de ramificação foi calculado considerando a proporção entre a soma do comprimento das ramificações laterais e o comprimento do eixo principal, segundo Morris et al. (2001). A área foliar foi medida utilizando um planímetro eletrônico (Li-3000A, Li-Cor) em plantas com 60 dias crescidas em casa de vegetação. A avaliação da área foliar para os mutantes hormonais foi feita utilizando-se folhas mais velhas (3º) e mais jovens (6º) totalmente expandidas. Os folíolos foram medidos separadamente e depois somados para evitar a sobreposição dos mesmos durante a medição. A média dos valores da área foliar foi obtida utilizando-se 4 repetições. Para os mutantes fotomorfogenéticos, foi avaliada a área foliar total, e para repetições foram utilizadas 10 plantas.

2.2.1.4 Área de células epidérmicas

Para medidas de área celular, foram utilizadas células epidérmicas foliares como referência. Para observá-las, foram retiradas “impressões” das superfícies adaxial e abaxial de folhas totalmente expandidas. Tais impressões foram retiradas utilizando uma mistura de resinas odontológicas (Xantopren VL Plus + Activator Universal/optosil-xantopren) segundo o método descrito por Weyers; Johansen (1985) e Poole et al., (1996). Após isso, os “imprints” reversos foram retirados do material impresso na resina, recobrando-se a mesma com uma fina camada de esmalte de unha. As impressões foram então observadas em microscópio ótico (20x), sendo a análise das dimensões celulares feita com auxílio do software QUANT (VALE, F.X.R; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2001) em imagens capturadas e digitalizadas.

2.2.1.5 Aspectos reprodutivos

A primeira inflorescência formada foi utilizada para a contagem do número de flores, em avaliações de 10 repetições. O peso e o número de frutos por planta foram obtidos utilizando-se 12 repetições, e para o número de lóculos por fruto foram utilizadas 10 repetições. O tempo para o amadurecimento do fruto foi avaliado utilizando-se 15 plantas, onde se observou, a partir da antese, um fruto por planta, o qual foi mantido na planta. O peso das sementes foi calculado utilizando-se 10 repetições de 100 sementes. Sólidos solúveis totais (SST) foram medidos em frutos frescos completamente maduros, utilizando um refratômetro digital (Atago PR-101). A avaliação foi realizada em 12 repetições para cada genótipo, utilizando um fruto por planta.

2.2.1.6 Análise estatística

Médias e erro padrão dos parâmetros foram estimados e, quando necessário, foi realizado teste “t” Student para comparação de médias.

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Obtenção e observação de fenótipo recombinante de mutações hormonais e fotomorfogenéticas no background Micro-Tom

Estudos comparativos utilizando mutantes podem ser limitados pela diferença entre backgrounds genéticos, visto que uma mesma função gênica pode ter efeitos diferentes dependendo das interações epistáticas com outros genes (TONSOR; ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF, 2005). Visando à obtenção de mutações em seis classes hormonais e em dois tipos diferentes de respostas fotomorfogenéticas (Tabelas 1 e 2) em uma única cultivar de tomateiro, retrocruzamentos sucessivos (introgressão) foram realizados utilizando MT como parental recorrente (Figura 1). Foi assim possível em pouco tempo e utilizando uma estrutura mínima, a obtenção de 19 novos mutantes no background MT. Uma abordagem alternativa para montagem de uma coleção equivalente seria a indução de mutações em MT (MEISSNER et al., 1997; WATANABE, et al., 2007; MATSUKURA et al., 2007). Contudo, o número de plantas a ser analisado e a estrutura requerida teria que ser expressivamente maior, e ainda assim não se teria garantia de que alelos com os mesmos efeitos daqueles já bem caracterizados na literatura (Tabelas 1 e 2) seriam encontrados. Além disso, para alguns locos, sobretudo aqueles onde o modelo escolhido já possui alelos nulos, a introgressão seria a maneira mais eficiente de se obter variações alélicas perceptíveis (ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF, 2000). No caso de MT, a introgressão não só permite incorporar nesse modelo variações alélicas presentes em outras cultivares, como também a rica variação genética natural das espécies selvagens de *Lycopersicon* (RICK, 1973; TAYLOR, 1986). Exemplos disso são *lp* e *atv*, provenientes respectivamente de *L. chmielewski* e *L. cheesmanii* e introgridos em MT no presente trabalho (Tabela 2), além do loco *Rg1* que aumenta a capacidade de regeneração *in vitro* proveniente de *L. peruvianum* (KOORNNEEF et al., 1993) e introgridido em MT em projetos anteriores (LIMA et al., 2004).

Tabela 1 - Mutantes hormonais introgrididos na cultivar Micro-Tom

Mutantes	Classe hormonal ¹	Efeito/ função gênica	Referência
<i>diageotropica (dgt)</i>	Auxina	Baixa sensibilidade. Gene defeitivo para biossíntese de uma ciclofilina, um possível componente da via transdução de sinal	(1) LA1093 cv VFN8
<i>Bushy root (brt)</i>	Citocinina	Baixa sensibilidade. Função gênica desconhecida	(2) LA2816 cv desconhecida
<i>Never ripe (Nr)</i>	Etileno	Baixa sensibilidade. Defectivo para receptor de etileno	(3) LA0162 cv Pearson
<i>epinastic (epi)</i>	Etileno	Alta produção de etileno. Função gênica desconhecida	(4) LA2089 cv VFN8
<i>sitiens (sit)</i>	ABA	Baixa produção de ABA. Defectivo para ABA-aldeído oxidase	(5) LA0574 cv Rheinlands Ruhm
<i>flacca (flc)</i>	ABA	Baixa produção de ABA. Defectivo para maturação do cofator Mo para ABA-aldeído oxidase	(6) LA0673 cv Rheinlands Ruhm
<i>notabilis (not)</i>	ABA	Baixa produção de ABA. Defectivo para a enzima NCED a qual cliva carotenóides	(7) LA0617 cv Lukulus
<i>gibberellin deficient1 (gib1)</i>	GA	Baixa produção de GA. Defectivo para conversão de GGDP a CDP	(8) LA2893 cv Moneymaker
<i>gibberellin deficient2 (gib2)</i>	GA	Baixa produção de GA. Defectivo para conversão de ácido <i>ent-7α</i> -hidroxicaurenóico a GA12-aldeído	(9) LA2894 cv Moneymaker
<i>gibberellin deficient3 (gib3)</i>	GA	Baixa produção de GA. Defectivo na conversão de CDP a ent-caurene	(10) LA2895 cv Moneymaker
<i>procera (pro)</i>	GA	Alta sensibilidade. Função gênica desconhecida	(11) LA0565 cv Condine Red
<i>Curl3 (cu3)</i>	BR	Baixa sensibilidade. Gene defeitivo para receptor de BR (<i>LeBRI1</i>), homólogo ao <i>BRI1</i> de <i>Arabidopsis</i>	(12) LA2398
<i>dumpy (dpy)</i>	BR	Baixa produção de BR. Provavelmente, defeitivo na conversão de 6-deoxocatasterona a 6-deoxoteasterona	(13) LA0811 cv desconhecida

¹ABA = ácido abscísico ; GA = giberelina; BR = brassinoesteroide. (1) Oh et al., 2006; (2) Pino-Nunes 2005; (3) Wilkinson et al., 1995; (4) Fujino et al., 1988; (5 e 6) Taylor et al., 2000; (7) Burbidge et al., 1999; (8, 9 e 10) Bensen e Zeevaart, 1990; (11) Jones, 1987; (12) Montoya et al., 2002; (13) Koka et al., 2000

Tabela 2 - Mutantes fotomorfológicos introgrididos na cultivar Micro-Tom

Mutantes	Tipo de mutação	Função gênica	Referência
<i>aurea (au)</i>	Deficiência na biossíntese do cromóforo do fitocromo	Defectivo para o gene da fitocromobilina sintase	(1) LA3280 cv Condine Red
<i>Yellow green2 (yg2)</i>	Deficiência na biossíntese do cromóforo do fitocromo	Provavelmente defeitivo para o gene da heme oxigenase	(2) LA2514 cv desconhecida
<i>high pigment1 (hp1)</i>	Respostas exageradas à luz	Defectivo para o gene homólogo ao gene <i>DDB1A</i> de <i>Arabidopsis</i> , o qual codifica uma proteína que interage com DET1 (HP2), um repressor da fotomorfogênese	(3) LA3004 cv Webb Special
<i>high pigment2 (hp2)</i>	Respostas exageradas à luz	Defectivo para o gene homólogo a <i>DET1</i> de <i>Arabidopsis</i> , um repressor negativo da fotomorfogênese	(4) LA2451 cv Manapal
<i>atroviolacea (atv)</i>	Respostas exageradas à luz	Trata-se uma variação natural vinda de <i>L. cheesmanii</i> , sendo provavelmente um alelo não funcional de um regulador negativo da fotomorfogênese	(5) LA0797
<i>Intense pigment (lp)</i>	Respostas exageradas à luz	Trata-se de uma variação natural vinda de <i>L. chmielewski</i> , sendo provavelmente um regulador positivo da resposta à luz, cujo alelo presente em tomateiro não é funcional	(6) LA1563

(1) Muramoto et al., 2005; (2) Terry e Kendrick, 1999; (3) Liu et al., 2004; (4) Mustilli et al., 1999; (5 e 6) Kendrick et al., 1997

Nos novos genótipos criados, o porte reduzido de MT mostrou ser aditivo a todos os fenótipos característicos das mutações hormonais ou fotomorfológicas (Figuras 2 e 3). Entre os vários fenótipos aditivos observados, destaca-se o extremo nanismo de mutantes deficientes em GA (e. g. *gib2*) ou insensíveis/deficientes a BR (*cu3* e *dpy*) no background MT (Figura 2A e B). No caso de *cu3* foram obtidas plantas adultas e férteis com menos de 3 cm de altura, sendo provavelmente um recorde na redução de tamanho em tomateiro. Já foi demonstrado que o fenótipo anão de MT é causado por pelo menos duas mutações recessivas, sendo uma delas alélica à mutação *dwarf* (LIMA et al., 2004; MARTÍ et al., 2006). Atualmente, sabe-se que a mutação *dwarf* é em um componente da via biossintética de brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999). Isso implica que MT possui níveis reduzidos de brassinoesteróides, embora não seja uma mutação drástica como ocorre em *dpy* (Figura 1A; KOKA et al., 2000). O fenótipo aditivo das mutações *cu3* e *dpy* em MT sugere que a segunda mutação que confere o nanismo

em MT não esteja seja relacionada a BR. Por outro lado, tanto a redução do tamanho de MT através da introgressão de mutações que levam à deficiência de GA, quanto o aumento proporcional desse, mas não o reestabelecimento da altura normal ao se introgridir a mutação *pro* (Figura 2C) de hipersensibilidade a GA, confirmam sugestão prévia de que o nanismo de MT não está relacionado primariamente com essa classe hormonal (MARTÍ et al., 2006). Além disso, ao contrário dos mutantes deficientes em GA em tomateiro (KOORNNEEF et al., 1990), MT apresenta porcentagem de germinação de sementes considerada normal para a espécie (Figura 4A e B).

Utilizando plantas na geração BC6Fn, consideradas linhagens quase isogênicas (NILs) à MT, vários aspectos do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, bem como parâmetros agrônômicos, foram avaliados. Um dos objetivos do presente estudo foi verificar se o background MT, apesar de por si só ser considerado um mutante que afeta o desenvolvimento, é adequado para estudos de respostas desenvolvimentais reconhecidamente controladas pela luz e por hormônios.

Figura 2 - Fenótipo dos mutantes hormonais introgridos na cv Micro-Tom (MT). **A)** Plântulas com 15 dias cultivadas em casa de vegetação. Note o gravitropismo negativo em raízes de *dgt*, excessiva ramificação em raízes de *brt* e *epi*, maior comprimento das raízes de *not*, maior e menor comprimento dos hipocótilos em *pro* e *dpy*, respectivamente e menor e maior espessura dos hipocótilos em *not* e *epi*, respectivamente. **B)** Fenótipo do mutante *cu3* (esquerda-acima) e *gib3* (esquerda-abixo), os quais possuem uma severa redução no tamanho e inibição da expansão foliar, quando comparados com MT. **C)** Fenótipo do mutante *pro*, o qual apresenta um maior alongamento do caule. **D-H)** aspecto da folha de MT (D), *dgt* (E), *epi* (F), *pro* (G) e *dpy* (H). Note a presença de hiponastia (E), epinastia (F e H) e margens pouco recortadas (G) quando comparados ao controle MT (D). **I)** formação de "umbigo" em frutos de *pro*. **J)** Germinação precoce (viviparidade) de sementes de *sit* no interior do fruto. **K)** Mutante *epi* apresentando folhas epinásticas e espessamento do caule. Note também que o efeito da mutação parece ser mais severo para as últimas folhas formadas. Uma descrição das alterações hormonais envolvidas em cada mutante encontra-se na tabela 1

Figura 3 - Fenótipo dos mutantes fotomorfogenéticos introgridos na cv Micro-Tom (MT). **A-J)** Aspectos fenotípicos do mutante *au* e *yg2*, os quais são deficientes na percepção à luz, e dos mutantes *hp1* e *2*, *lp* e *atv*, os quais respondem exageradamente à luz. **A)** Plântulas de *au*, MT e *hp1* crescidas no escuro (esquerda) e luz (direita). No escuro, os três genótipos não diferem no comprimento do hipocótilo, porém, na luz, *au* apresenta-se estiolado e *hp1* possui um desestiolamento evidente comparado ao de MT. **B)** Porte reduzido e mais ramificado em *hp1*. O porte reduzido de *hp1* reflete o menor comprimento de seu caule desde a formação do hipocótilo visto em A. **C)** O estiolamento de *au* mesmo na luz produz plantas mais altas, cloróticas e menos ramificadas. **D)** Um acúmulo de antocianinas, além da pigmentação verde escuro, pode ser observada nas folhas de *hp2*. **E)** Acúmulo de antocianinas no hipocótilo de *hp1* germinado na luz, o qual tende a germinar primeiro que MT nessa condição, mas não no escuro (ver Figura 4). **F)** Maior pigmentação nos frutos de *lp*. **G)** Maior pigmentação nas folhas de *hp1*, o qual em geral não mostra acúmulo visível de antocianinas nesse órgão como visto em *hp2*. **H)** Frutos com maior pigmentação em *hp1*, sendo um efeito mais pronunciado que em *lp* visto em F. **I)** Acúmulo de antocianinas nos caules de *atv*. **J)** O acúmulo de antocianinas nos caules adultos dos mutantes *hp1* e *hp2* não difere visualmente de MT, visto aqui. **K)** A menor diferenciação de cloroplastos e acúmulo de clorofila tanto em *au* quanto em *yg2* faz com que o duplo *au yg2* seja praticamente albino, o qual curiosamente não completa o ciclo. A descrição dos mutantes fotomorfogenéticos e funções gênicas alteradas encontram-se na tabela 2

2.2.2.2 Efeito das mutações hormonais e fotomorfológicas na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de Micro-Tom na luz e no escuro.

2.2.2.2.1 Germinação de sementes

Embora virtualmente todas as classes hormonais já tenham sido associadas à germinação de sementes (MATILLA, 2000; LEUBNER-METZGER, 2001; RAMPEY et al., 2004; KUCERA; CHON; LEUBNER-METZGER, 2005), os hormônios mais evidentes associados a esse evento são GA e ABA (BRADY; MCCOURT, 2003). Além disso, na percepção da luz para a germinação, o fitocromo é o mais conhecido fotorreceptor controlando essa resposta (EISENSTADT; MANCINELLI, 1974). Conforme esperado, o mutante deficiente em ABA, *not*, mostrou uma evidente redução no tempo necessário para a germinação de 50% das sementes, tanto na luz quanto no escuro quando comparado ao MT (Figuras 4A e B). Um reflexo disso é que em casos extremos de deficiência de ABA, como ocorre em *sit*, pode haver viviparidade (Figura 2J), ou seja, germinação de sementes no tecido materno (frutos). Ao contrário de ABA, GA é considerado o principal estimulador da germinação, sendo coerente a constatação de que o mutante supersensível a essa classe hormonal (*pro*) apresenta germinação rápida tanto na luz quanto no escuro (Fig. 4A e B). Um outro hormônio associado à germinação é o etileno (MATILLA, 2000; KUCERA et al. 2005). O adiantamento da germinação de *Nr* no background MT, tanto na presença quanto na ausência da luz, demonstrou comportamento similar ao relatado em tomateiro ou em mutantes equivalentes em *Arabidopsis* (SIRIWITAYAWAN; GENEVE; DOWNIE, 2003), apesar de *epi* não ter diferido estatisticamente de MT (Figuras 4A e B). Embora já seja relatado que CKs possuem um papel na germinação de algumas espécies (BLACK; BEWLEY; FOUNTAIN, 1974; STIRK et al., 2005; NIKOLIĆ et al., 2006), o atraso e a diminuição na porcentagem final de germinação de *brt* (Figuras 4A e B) podem ser indiretamente devido à escassez de reservas dessas sementes, já que apresentam tamanho e peso reduzidos (Figura 5, Tabela 3). Apesar do papel das auxinas durante embriogênese ser bem conhecido, pouco é sabido a respeito da atividade desse hormônio na germinação de sementes (KUCERA; CHON; LEUBNER-METZGER, 2005). O mutante pouco sensível à auxina, *dgt*, apresentou um adiantamento da germinação somente na luz (Figuras 4A e B), sugerindo interação com fitocromo ou outros receptores. De modo

oposto, a mutação que causa deficiência em BR, *dpy*, levou a um atraso na germinação muito mais proeminente na luz do que no escuro (Figuras 4A e B). Assim como para a maioria das mutações hormonais, o background MT manteve as respostas esperadas para mutantes fotomorfogênicos, sendo que nossos resultados (Figura 4) deixaram evidentes o já bem documentado efeito de *au* no atraso da germinação (KOORNNEEF et al., 1985; GEORGHIOU; KENDRICK, 1991; LERCARI; LIPUCCI DI PAOLA, 1991) e a não alteração de resposta em *hp1* (THOMPSON, 1962; KERR, 1965; RICK, 1974; KERCKHOFFS et al., 1997).

2.2.2.2 Alongamento do hipocótilo

Apesar de ser um órgão simples sob o ponto de vista morfológico, os fatores que controlam o alongamento do hipocótilo ainda permanecem pouco elucidados. O efeito da luz na inibição do alongamento é o resultado de uma via de transdução de sinais que começa com os fotorreceptores, mas que a partir deles ainda há muitos componentes a serem desvendados (SCHEPENS; DUEK; FANKHAUSER, 2004). Hormônios vegetais são os prováveis fatores que participam dessa via (HALLIDAY; FANKHAUSER, 2003), já que são bem conhecidos os efeitos desses na promoção ou inibição do alongamento do hipocótilo (COLLET; HARBERD; LEYSER, 2000; VANDENBUSSCHE et al., 2005; VANDENBUSSCHE et al., 2007). No presente estudo, o comprimento do hipocótilo de mutantes fotomorfogênicos e hormonais foi medido após dez dias de cultivo no escuro ou em fotoperíodo de 16 horas. A razão entre o comprimento do hipocótilo na luz e no escuro facilita a identificação, por exemplo, de mutações com menor capacidade de estiolamento no escuro ou desestiolamento na luz (razão representada por frações mais próximas de 1,0). O mutante *au*, deficiente em fitocromo, é um desses casos, já que a falta de percepção da luz fez com que seu alongamento seja pouco inibido na luz (Figuras 4C e 3A). De modo inverso, o mutante com resposta exagerada à luz, *hp1*, teve o menor valor dessa razão devido à maior inibição do alongamento do hipocótilo na luz (Figuras 4C e 3A). Esses resultados estão de acordo com o esperado para esses mutantes (KOORNNEEF et al., 1985; PETERS et al., 1989; VAN TUINEN et al., 1996; KERCKHOFFS et al., 1997) e evidenciam que o nanismo de MT e a redução dos níveis endógenos de BR devido à mutação *dwarf* em nada impedem que esse background seja

um modelo para o estudo da fotomorfogênese. Além disso, o fenótipo de todos os mutantes fotomorfogenéticos aqui introgridos em MT reproduziram as características presentes nos parentais, como as alterações no acúmulo de antocianinas em hipocótilos e caules, no acúmulo de clorofila em folhas e frutos, além do alongamento dos caules (Figura 3).

Quanto aos mutantes hormonais, *dgt*, *pro*, *epi* e *dpy* apresentaram maior razão entre o comprimento do hipocótilo na luz e no escuro. O valor mais próximo de 1,0, no caso do mutante hipersensível à GA (*pro*), pode ser atribuída ao fato desse genótipo ter um crescimento proeminente do hipocótilo na luz (Figuras 4C e 5A). Ao contrário de *pro*, a diminuição da diferença entre luz e escuro em *dgt*, *epi* e *dpy* pode ser atribuída preferencialmente à inibição do alongamento no escuro, embora *epi* e *dpy* tenham apresentado redução do crescimento também sob luz (Figuras 4C e 5A). A associação entre AUX (*dgt*) e GA (*pro*) com o alongamento no escuro e na luz, respectivamente, foi sugerido anteriormente para tomateiro e outros modelos vegetais (KIM et al., 1996; COWLING; HARBERD, 1999; KRAEPIEL et al., 2001). Do mesmo modo, a resposta observada em *epi* está de acordo com a conhecida atividade inibitória do etileno no alongamento do hipocótilo (BINDER et al., 2004; COLLET; HARBERD; LEYSER, 2000; BARRY et al., 2001). Além do papel inerente à cada classe hormonal no alongamento do hipocótilo, os resultados parecem indicar que a luz tem um papel fundamental na regulação da atividade dos hormônios e de suas vias de sinalização. Um mutante que teve seu hipocótilo bastante inibido no escuro foi o deficiente em BR (*dpy*), o que coincide com as observações de que mutantes equivalentes em *Arabidopsis* são desestiolados no escuro (CHORY et al., 1989; LI; CHORY, 1997).

2.2.2.2.3 Alongamento da raiz

Além das raízes serem comparativamente um órgão pouco estudado, praticamente inexitem trabalhos onde se compara seu crescimento nas condições de luz e escuro. Ao realizarmos a análise sistemática do alongamento da raiz, constatamos que para a maioria dos genótipos o comportamento desse órgão é exatamente o oposto ao hipocótilo, ou seja, há um maior alongamento da raiz primária na luz do que no escuro (Figura 4D). Considerando que a resposta à luz é primariamente nos caules, já

que esses são órgãos normalmente expostos a esse fator ambiental, pode se conjecturar que a resposta das raízes é indireta, sendo regida pela força do dreno estabelecido no hipocótilo durante seu estiolamento ou desestiolamento (DROZDOVA et al., 2001). Contudo, as diferenças no comprimento das raízes também podem ser o efeito direto da luz, visto que esses órgãos expressam os genes para os principais fotorreceptores (PRATT et al., 1997; MOLAS; KISS; CORRELL, 2006). Independente de qual for o mecanismo que explica o maior alongamento da raiz na luz (resposta fotomorfogenética direta, relação fonte-dreno, ou ambos), tal comportamento parece favorecer a evitação da luz nas raízes, algo oposto e ao mesmo tempo complementar à conhecida evitação do escuro (estiolamento) dos caules.

Figura 4 - Germinação de sementes e crescimento de plântulas dos mutantes hormonais e fotomorfogenéticos. Tempo (dias) para germinação de 50% das sementes em condições de luz (**A**) e escuro (**B**). Os números entre parênteses representam a porcentagem final de germinação. Foram consideradas germinadas sementes que apresentaram protrusão da radícula. **C e D**) comprimento do hipocótilo e da raiz, respectivamente, em plântulas crescidas na luz (barras brancas) e no escuro (barras escuras) durante 10 dias. Os números entre parênteses representam a razão entre o comprimento do hipocótilo na luz e no escuro. As linhas verticais em cada barra indicam o erro padrão das médias (n = 3x50 para germinação e n = 20 para comprimento do hipocótilo e da raiz)

Figura 5 - Fenótipos adicionais dos mutantes hormonais na cultivar MT. **A)** A alta sensibilidade ao GA no mutante *pro* não promove um maior alongamento do hipocótilo no escuro comparado ao MT, embora ele seja mais alongado na luz. É possível também observar a exagerada inibição do alongamento do hipocótilo dos mutantes superprodutores de ET (*epi*) e deficiente em BR (*dpy*) tanto no escuro quanto no claro. **B)** O amadurecimento incompleto dos frutos do mutante pouco sensível a ET (*Nr*) gera frutos de cor amarela. **C)** A deficiência na biossíntese de ABA no mutante *not* provoca murchamento da planta nas horas mais quentes do dia. **D)** A mutação *sit*, de deficiência de ABA, continua produzindo plantas murchas e de porte reduzido, mesmo em combinação com mutação que reduz sensibilidade a ET (*Nr*). **E)** Morfologia das flores em alguns mutantes. Em *brt* ocorre uma redução no tamanho das sépalas, o que lembra sua reduzida área foliar (Figura 7C). O mutante *epi* apresenta um aumento no número de pétalas além das mesmas apresentarem-se mais fundidas. Em *pro*, ocorre um alongamento e estreitamento das pétalas, semelhante ao efeito dessa mutação no alongamento de caules (Figura 2G). Em *dpy* há uma severa redução em todos os verticilos, incluindo estames e pistilos (não mostrado). **F)** A baixa sensibilidade às citocininas em *brt* reduz o tamanho das sementes

2.2.2.3 Efeito das mutações hormonais e fotomorfogenéticas no crescimento vegetativo de plantas adultas de Micro-Tom crescidas em casa de vegetação

2.2.2.3.1 Altura do caule principal e matéria seca de caules e raízes

Mutantes hormonais apresentaram consideráveis diferenças quanto à altura do caule e acúmulo de matéria seca após 56 dias de cultivo em casa de vegetação (Figura 6). Se considerarmos que AUX, CK e GA são importantes para processos celulares básicos de crescimento, como divisão e expansão (JONES et al., 1998; JONES, 1980; RIOU-KHAMLICHI et al., 1999), não é surpresa que o mutante *dgt*, pouco sensível à AUX, e *brt*, pouco sensível à CK, tenham apresentado menor acúmulo de matéria seca em caules e raízes (Figura 6B) e que *pro*, hipersensível à GA, tenha formado plantas mais altas em comparação às plantas de MT (Figura 6A). A deficiência de ABA em *not* levou a uma redução do comprimento do caule principal, a qual só foi superior ao extremo nanismo apresentado pelo mutante deficiente em BR, *dpy* (Figura 6A). O acúmulo de matéria seca nos mutantes *not* e *dpy* também foi bastante reduzido tanto nos caules quanto nas raízes (Figura 6B). Entre os fatores que podem contribuir para a redução do crescimento de mutantes deficientes em ABA está a constante perda de turgor devido à não regulação estomática e consequente murchamento (Figura 5C). Contudo, já foi demonstrado que a deficiência em ABA causa uma elevação nos níveis endógenos de etileno, o que por sua vez poderia contribuir para a redução do crescimento nesses mutantes independentemente da perda de turgor (TAL et al., 1979; SHARP et al., 2000). Em nossas análises, o mutante com elevado nível endógeno de etileno, *epi*, não diferiu de MT quanto ao comprimento do caule principal (Figura 6A), além de apresentar um proeminente acúmulo de matéria seca tanto nos caules quanto nas raízes (Figura 6B). Uma das perspectivas de se ter mutantes em um mesmo background genético é a possibilidade de análise de duplos mutantes. Um dos vários duplos mutantes que estão sendo produzidos em nosso laboratório combina a deficiência em ABA, presente em *sit*, com baixa sensibilidade ao ET, de *Nr* (Figura 5D). O fenótipo de *sit Nr* não só confirma a sugestão de que o etileno não explica totalmente a redução do crescimento em mutantes deficientes em ABA (SHARP et al., 2000), como também coloca em evidência que o papel do etileno é complexo, podendo ser repressor

(ABELES; MORGAN; SALTVEIT, 1992) ou estimulador (SATLER; KENDE, 1985) do crescimento.

2.2.2.3.2 Dominância apical

Cinco tipos de mutações levaram a um aumento significativo no alongamento de ramificações laterais em comparação ao MT (Figura 6C): deficiência de ABA (*not* e *sit*), baixa sensibilidade à auxina (*dgt*), citocinina (*brt*) e etileno (*Nr*), além de aumento na resposta a fitocromo (*hp1*). Por outro lado, o excesso de etileno em *epi* e a deficiência de fitocromo em *au* levaram a uma diminuição no alongamento de ramificações laterais (Figura 6C, 2K e 3C). Tal diversidade de mutantes afetando um mesmo processo evidencia claramente que o crescimento de ramificações laterais ou, de modo inverso, a dominância apical é um evento multifatorial, embora uma ênfase muito grande tem sido dada ao hormônio auxina, além da luz ser considerada como modulador da resposta e não efector principal.

As alterações no padrão de ramificação dos mutantes fotomorfogênicos, *au* e *hp1* (Figuras 6C, 3B e 3C), não são surpresas se considerarmos que o crescimento relativo de órgãos ocorre em função da relação fonte-dreno, a qual não só é controlada pela disponibilidade de nutrientes quanto de luz (GOLOVKO; DYMOVA; TABALENKOVA, 2004; PERES et al., 2005). O processo de dominância apical é dependente do efeito da auxina na inibição de gemas laterais (MCSTEEN; LEYSER, 2005), as quais costumam reassumir o crescimento se as citocininas, um importante estabelecedor de drenos (ROITSCH; EHNEß, 2000), acumulam em tais gemas (LI et al. 1995). Sendo assim, embora seja coerente que *dgt* tenha baixa dominância apical, é surpreendente que *brt* também possua. Uma inesperada perda de dominância apical também foi observado recentemente em plantas transgênicas e combinações de mutantes de *Arabidopsis* com reduzido nível endógeno ou sensibilidade a CKs (WERNER et al., 2003; RIEFLER et al., 2006). Esses resultados somados à informação de que plantas transgênicas ou mutantes com superprodução de citocininas também possuem reduzida dominância (CHAUDHURY et al., 1993; RUPP et al., 1999) sugerem que o que há de comum nesses genótipos é a falha no estabelecimento de gradientes de CKs e drenos preferências.

As respostas dos mutantes em ABA (*sit* e *not*) e ET (*Nr* e *epi*) podem refletir o efeito desses hormônios na dormência de gemas laterais (GALLOCH; ZELINSKA; BURKACKA-LAUKAITYS, 1998; LE BRIS et al., 1999). Além do ABA e ET, hoje é conhecida a ocorrência de um inibidor derivado de carotenóides e diferente de ABA (BOOKER et al., 2004). Como tal inibidor é translocável por enxertia (BOOKER et al., 2004), tanto a disponibilidade de mutantes hormonais (Tabelas 1 e 2) e na biossíntese de carotenóides (ISAACSON et al., 2002), quanto às facilidades de se fazer enxertia podem tornar o tomateiro, e mais especificamente MT, um modelo atraente para o estudo das ramificações laterais.

Figura 6 - Crescimento de plantas adultas de mutantes hormonais no background MT sob condições de casa de vegetação. **A)** curvas de crescimento dos mutantes hormonais obtidas através de medições periódicas durante 56 dias. **B)** massa da matéria seca dos caules (barras brancas) e raízes (barras escuras) de plantas com 60 dias de idade (n = 7). **C)** Índice de ramificação caulinar calculado pela razão entre o comprimento do caule principal e a somatória dos comprimentos dos ramos laterais (n = 7)

2.2.2.3.3 Área foliar e de células epidérmicas

Para avaliar a área foliar dos mutantes hormonais (Figura 7) foram utilizadas folhas mais velhas (3^a) e jovens (6^a) totalmente expandidas (Figura 8) de plantas com 60 dias. Quatro mutações afetaram mais severamente a área foliar: baixa sensibilidade à AUX (*dgt*) e CK (*brt*) e deficiência de ABA (*not*) e BR (*dpy*). Esses resultados estão de acordo com o papel de AUX e CK na divisão e expansão celular (CLELAND, 1991; RAYLE; NOWBAR; CLELAND, 1991, RIOU-KHAMLICHI et al., 1999), o que parece se refletir na pequena área das células epidérmicas dos mutantes *dgt* e *brt* (Figura 7C). Deficiência em ABA também pode causar redução na área celular, como pode ser evidenciado em *flc* (Figura 7C). Isso poderá ser o efeito da perda de turgor para expansão ou do acúmulo de etileno relatado para esse tipo de mutação (TAL et al. 1979; SHARP et al., 2000). De fato, o mutante superprodutor de etileno, *epi*, apresentou uma redução na área celular. Contudo, como não há diferenças entre as áreas foliares de *epi* e MT (Figura 7A), sugere-se que essa mutação causa uma maior proliferação das células da folha. Um efeito oposto deve ser atribuído à deficiência de BR ou insensibilidade a esse esteróide vegetal, pois apesar de *dpy* apresentar uma severa redução da área foliar, a área celular de *cu3*, uma mutação com efeito equivalente, significativamente da área celular em MT. A alta sensibilidade a GA em *pro* também parece levar a uma menor proliferação de células da folha, já que apesar desse mutante possuir células epidérmicas maiores que as de MT, sua área foliar não é maior.

Apesar da evidente modulação da expansão foliar em resposta à luz, pouca diferença foi encontrada ao se comparar a área foliar total de MT à dos mutantes fotomorfogenéticos *au* e *hp1* (Figura 7B). Contudo, chama a atenção o aspecto clorótico das folhas do mutante deficiente em fitocromo (Figura 3C) e o verde escuro do mutante com aumento de resposta a esse fotorreceptor (Figura 3G), demonstrando que o fotorreceptor controla preferencialmente as vias de transdução de sinal que levam ao desenvolvimento de cloroplastos, tendo uma função secundária no controle da expansão da área foliar. Alterações morfológicas também foram observadas em folhas dos mutantes hormonais, como ocorrência de hiponastia em *dgt* (Figura 2E), epinastia em *epi* e *dpy* (Figuras 2F, H e K) e a simplificação da arquitetura foliar em *pro* com a tendência à redução no número de folíolos e ocorrência de bordos menos serrilhados

(Figura 2C e G). Esses efeitos, embora pouco relatados, são coerentes com o papel dessas classes hormonais (HAYES, 1978; GRAY, 1957; HAY; CRAFT; TSIANTIS, 2004).

Figura 7 - Efeito de mutações hormonais e fotomorfogenéticas no crescimento das folhas. A) Área foliar da 3ª e 6ª folhas (ver diagrama na Figura 8), as quais encontravam-se totalmente expandidas em plantas com 60 dias de idade (n = 4). B) área foliar total dos mutantes fotomorfogenéticos medida em plantas com 60 dias (n = 10 plantas). C) área celular da epiderme foliar abaxial

2.2.2.4 Efeito das mutações hormonais e fotomorfogenéticas no crescimento reprodutivo de plantas adultas de Micro-Tom crescidas em casa de vegetação.

O tomateiro é um modelo complementar para o estudo do crescimento reprodutivo, já que possui uma série de características desenvolvimentais não presentes em *Arabidopsis*, tais como ausência de crescimento em roseta e formação de escapo floral, florescimento simpodial e ausência de resposta ao fotoperíodo e presença de frutos carnosos e climatéricos. Além disso, os conhecimentos adquiridos nesse modelo possuem interesse agrônômico direto.

No presente trabalho, vários parâmetros do desenvolvimento reprodutivo foram analisados nos mutantes hormonais e fotomorfogenéticos (Figura 8 e Tabela 3). Algumas das alterações do crescimento reprodutivo apresentadas pelos mutantes hormonais parecem ser derivações da mesma ação hormonal, porém em órgãos diferentes. Um exemplo disso é a morfologia floral de alguns mutantes (Figura 5E). Desse modo, o tamanho diminuto das sépalas de *brt* reproduz a redução de sua área foliar (Figura 7A). O mesmo paralelismo pode ser traçado entre o alongamento caulinar de *pro* (Figura 6A) e a presença de pétalas longas nesse mutante. De modo oposto, pode se observar o tamanho reduzido tanto das plantas (Figura 2A) quanto das flores (Figura 5E) do mutante *dpy* (Figura 2A). O mutante *epi* apresentou folhas com pétalas mais largas e em maior número, o que segue a tendência de crescimento lateral nesse mutante (Figura 2A e 2K).

Nas condições de casa de vegetação (ver Material e Métodos), todos os mutantes estudados, com exceção de *au*, tiveram um atraso na antese quando comparados ao MT (Figura 8). O atraso na antese pode ser devido a um crescimento vegetativo lento ou, alternativamente, a um prolongamento desse, o que pode ser evidenciado pela formação de um maior número de folhas até a primeira inflorescência. Com exceção dos mutantes *dgt* e *hp1*, os mutantes que atrasaram a antese prolongaram seu crescimento vegetativo formando de 10 a 13 folhas antes do florescimento, contra 9 de MT. Desse modo, deficiência de BR (*dpy*), hipersensibilidade a GA (*pro*), deficiência de ABA (*not*), excesso de etileno (*epi*) e baixa sensibilidade a citocininas (*brt*) estenderam o crescimento vegetativo. Os resultados aqui apresentados sugerem um papel dessas classes hormonais na transição entre o crescimento vegetativo e reprodutivo de

tomateiro, o que precisa ser melhor investigado em estudos futuros. O fato do mutante deficiente em fitocromo, *au*, ter tido uma antese adiantada em aproximadamente sete dias e uma redução consistente no número de folhas até esse evento, sugere também um papel do fitocromo na floração de tomateiro, mesmo que essa espécie possua pouca reposta a fotoperíodo. Interessantemente, a análise de caracteres quantitativos (QTL-*quantitative trait locus*) responsáveis pelo controle da transição para o desenvolvimento reprodutivo em uma população de mapeamento F2 entre *Lycopersicon esculentum* e o parente selvagem *Lycopersicon chmielewskii*, de florescimento tardio, identificou *PHYB2* como um dos QTLs que controla o tempo para o florescimento (Jiménez-Gómez et al., 2007). Os autores sugerem que durante a domesticação do tomateiro, *PHYB2* tenha sido alvo de intensa pressão de seleção para materiais com ausência de resposta fotoperiódicas.

A partir da antese até o amadurecimento do fruto, várias respostas consideradas de importância agrônômica foram verificadas nos mutantes. Entre as alterações observadas, pode se destacar: **i)** aumento no número de flores por inflorescência em *au* e diminuição em *pro*, **ii)** tendência da maioria dos mutantes em formar 2 lóculos por fruto, em oposição aos 3 de MT, bem como o aumento do número de lóculos por fruto em *pro*, **iii)** expressiva diminuição no número de sementes por fruto em *not*, *epi* e *dpy*, **iv)** aumento do peso da semente em *epi*, *pro*, *hp1* e a diminuição em *brt* e *gib3*, **v)** aumento do peso do fruto em *epi* e *hp1* e a diminuição em todos os demais, com exceção de *au*, **vi)** elevada produtividade (peso total dos frutos por planta) em *Nr*; **vii)** diminuição do tempo para o amadurecimento em *epi* e *au* e extensão desse em quase todos os demais mutantes, principalmente em *Nr* e *brt*, **viii)** aumento dos sólidos solúveis totais em *pro*.

Além de muitas das respostas aqui apresentadas serem inéditas e merecerem estudos futuros, outras tantas coincidem com aquelas já reportadas para as mesmas mutações em outros backgrounds ou são coerentes com o efeito esperado para a molécula mutada. Um exemplo disso é o aumento no tempo de amadurecimento observado no mutante pouco sensível a etileno, *Nr* (Figura 5B), e a diminuição desse no mutante superprodutor, *epi*, dessa classe hormonal. Entre as repostas divergentes ou inéditas por nós encontradas está a diminuição do tamanho das sementes do mutante

pouco sensível a CKs, o que é oposto ao encontrado em *Arabidopsis* tanto na deficiência quanto na redução da sensibilidade a essa classe hormonal (WERNER et al., 2003; RIEFLER et al., 2006). Esses resultados podem refletir as diferenças no estabelecimento das sementes como drenos em frutos secos e carnosos.

Em termos agrônômicos, o resultado mais expressivo foi a constatação que tanto frutos partenocárpicos quanto polinizados de *pro* apresentaram um elevado teor de SST (Tabela 3). Além da partenocarpia, esse mutante também apresentou uma tendência para o desenvolvimento de frutos com “umbigo” (Figura 2I), algo nunca reportado para esse mutante, mas que coincide, por exemplo, com o fenótipo apresentado por variedades de laranjas partenocárpicas (DAVIES, 1986). O efeito de alterações hormonais no teor de SST em tomateiro havia sido documentado anteriormente para plantas transgênicas com superprodução de CKs nos ovários (MARTINEAU et al., 1995), mas não para mutações afetando GA.

Os resultados acima apontam para o potencial da exploração de mutações hormonais para o melhoramento genético do tomateiro, o que já vem sendo feito em outras espécies. Desse modo, mutações que causam redução na biossíntese de GA em arroz (SASAKI et al., 2002), na sensibilidade a GA em trigo (PENG et al., 1999) e na atividade de transportadores de auxina em milho e sorgo (MULTANI et al., 2003) provaram ser úteis no melhoramento que objetiva a redução no porte das plantas, consequentemente aumentando o índice de colheita e resistência ao acamamento (BORLAUG, 1983). A perda de função de uma citocinina oxidase em arroz também provou ser o responsável por um loco que causa um aumento na produtividade através da formação de um maior número de grãos por panícula (ASHIKARI et al., 2005). No caso de espécies de frutos carnosos, como o tomateiro, aparentemente o maior impacto de mutações hormonais ou fotomorfogenéticas seja sobre a qualidade do fruto ao invés da produtividade. A exemplo disso, apesar do desenvolvimento vegetativo de mutantes fotomorfogenéticos de tomateiro apresentar aspectos deletérios, como o estiolamento na luz em *au* (Figura 3C) e o nanismo em *hp1* (Figura 3B), já foram demonstradas melhorias na qualidade dos frutos desse tipo de mutante. Desse modo, os frutos de mutantes com deficiência de fitocromo B podem ter maiores teores de SST (ALBA et al., 1999), além dos frutos dos mutantes com excesso de resposta a luz tenderem a possuir

mais antioxidantes do tipo carotenóides, flavonóides e vitamina C e E (YEN et al., 1997; COOKSON et al., 2003; ANDREWS; FAHY; FOYER, 2004; BINO et al., 2005; TORRES et al., 2006). No presente estudo, a mutação *pro* levou também a uma diminuição da produtividade, porém seu incremento no teor de SST é em média de 60%. Algumas espécies do gênero *Lycopersicon* possuem teor de SST duas vezes superior ao do tomateiro (TAYLOR, 1986). Porém, sua herança é poligênica e o máximo incremento conseguido com os genes de maior efeito oriundos de tais espécies é de 20% (FRIDMAN et al., 2004). A combinação da mutação *pro*, descoberta aqui como uma maneira de incrementar o grau brix de tomateiro, com outras mutações que possam corrigir seus aspectos deletérios pode gerar genótipos de alto interesse para o melhoramento.

Figura 8 - Representação esquemática de uma planta de MT com 60 dias de idade. Barras em forma de “T” representam folhas com 5 folíolos (com exceção das folhas 1 e 2, as quais tendem a ter 3 folíolos) e pequenas esferas representam inflorescências com 7 flores. A folha número 9 foi circutada por ser a hospedeira da primeira inflorescência em MT. A folha hospedeira varia para cada mutante, sendo seu número mais freqüente representado na tabela ao lado e a freqüência colocada entre parênteses. Esse parâmetro, assim como o tempo para antese de 50% das plantas é indicativo de modificações desenvolvimentais que podem aumentar ou diminuir o crescimento vegetativo em oposição ao florescimento. Notar que MT possui crescimento determinado (formação de duas inflorescências consecutivas) devido à presença da mutação *selfpruning* (*sp*). Nenhum dos mutantes hormonais ou fotomorfogenéticos alterou esse hábito de crescimento no background MT

Table 3 - Parâmetros analisados em flores e frutos de mutantes hormonais e fotomorfogenéticos na cultivar Micro-Tom

	Flores por inflorescência	Lóculos por fruto	Sementes por fruto	Peso da semente (g)	Peso do fruto (g)
MT	7.2±0.6	3(70%)	41.3±5.5	2.3±0.04	5.1±0.3
dgt	8.5±0.9	2(55%)	36.5±4.6	2.2±0.02	3.4±0.3
brt	7.8±0.5	3(70%)	33.3±2.6	1.6±0.02	3.8±0.4
not	7.1±0.5	2(70%)	20.4±2.0	2.5±0.03	3.7±0.2
Nr	7.6±0.7	2(80%)	39.1±5.6	2.2±0.02	2.6±0.5
epi	7.2±0.9	2(70%)	26.3±3.9	3.0±0.02	11.8±0.5
pro¹	4.6±0.4	4(85%)	-	-	3.4±0.2
pro²	-	-	-	2.7±0.03	-
gib3	-	-	-	2.0±0.03	-
dpy	6.1±0.2	2(70%)	22.4±3.8	2.3±0.01	4.0±0.4
au	10.8±0,5	2 (70%)	41±2.1	2.2±0.01	5.1±0.3
hp1	8±0,6	2 (80%)	31.1±1.8	2.7±0.02	9.4±0.4

	Peso total de frutos por planta (g)	Tempo (Dias) para amadurecimento do fruto	SST1	SST2	SST3
MT	43.4±1.9	53.4±1,3	5.3±0.1	5.1±0.0	4.6±0.1
dgt	28.6±1.8	57.2±1,4	5.8±0.2	5.6±0.2	-
brt	41.9±3.4	59.5±1,5	5.4±0.1	5.4±0.1	-
not	22.2±2.6	56±0,7	6.0±0.1	6.0±0.1	-
Nr	59.3±3.1	63.3±1,4	5.2±0.1	4.9±0.1	-
epi	33.6±4.8	42.1±1,0	-	4.6±0.1	-
pro¹	45.4±2.5	54.8±2,3	9.1±0.5	7.5±0.5	-
pro²	-	-	8.1±0.2	-	-
gib3	-	-	-	-	-
dpy	12.4±1.5	58.7±2,6	4.9±0.0	4.8±0.1	-
au	40±0.8	48.6±1.0	-	-	5.0±0.1
hp1	44.5±1.1	58±2.0	-	-	5.4±0.1

¹Frutos partenocárpico, ²Frutos formados a partir de polinizações artificiais, SST1 = total de sólido solúveis (Brix) realizado no inverno de 2005, SST2 = realizado no verão de 2006 e SST3 = realizado no outono de 2007

2.2.2.5 Limitações e novas perspectivas para o uso de MT como modelo

No presente trabalho, evidenciamos que os genes conferem o nanismo, como por exemplo *dwarf* (*d*), de MT não impedem que respostas desenvolvimentais controladas por hormônios ou por fitocromo sejam estudadas. Além dos genes de nanismo, MT é portador dos alelos recessivos *selfpruning* (*sp*), o qual causa um crescimento

determinado, e *uniform ripening* (*u*), que provoca ausência de ombro verde nos frutos. Essas variações alélicas também são presentes em outras cultivares de tomateiro, as quais inclusive vêm sendo propostas como modelo para o estudo integrado de um grande número de mutações (MENDA et al., 2004). Faz se necessário considerar que uma vez que se use o controle adequado, a presença de outras mutações ou variações alélicas em uma cultivar não impedem seu uso para o estudo do efeito de mutações específicas. Contudo, se o evento estudado é influenciado pela referida mutação, o ideal é que se tenha NILs portadoras do alelo selvagem como controle. Desse modo, utilizando a abordagem de introgressão aqui considerada, NILs contendo os alelos selvagens para *U* e *Sp*, além de *D*, no background MT também foram produzidas (Figura 9).

Figura 9 - Linhagens isogênicas a MT carregando alelos selvagens para os genes *DWARF* (*D*), *SELFPRUNING* (*SP*) e *UNIFORM RIPENING* (*U*). **A)** A planta portando alelo *D* continua com porte reduzido, mas possui folhas não rugosas e é expressivamente maior que MT. **B)** O alelo selvagem *SP* no background MT produz plantas com porte um pouco maior, devido ao crescimento estendido de seus ápices vegetativos. Notar a presença de folhas entre uma inflorescência e outra em *SP*. **C)** Plantas portando o alelo *U* possuem frutos com “ombro” verde. A cor pálida e brilhante dos frutos de MT é o resultado não só da mutação *u* como também de *uniform gray-green* (*ug*)

O pequeno porte e ciclo de vida rápido de MT tornaram esse modelo atraente para pesquisa básica desde sua proposta inicial (MEISSNER et al., 1997). A abordagem de introgressão, sobretudo de variações genéticas naturais aqui apresentadas, além de incrementar em muito as possibilidades de pesquisas básicas que poderão ser realizadas com esse modelo, abre a perspectiva de explorar MT também no melhoramento de tomateiro. Desse modo, se considerarmos que MT difere das cultivares comerciais em poucas mutações recessivas, há a perspectiva de seu uso para facilitar a piramidação de caracteres monogênicos e dominantes, já que isso exige a triagem de um grande número de plantas durante várias gerações. Exemplo de genes dominantes vindos de espécies selvagens de *Lycopersicon* que poderiam ser piramidados em uma só cultivar são os que conferem resistência a diferentes patógenos (ARIE et al., 2007). A introgressão de tais genes em um mesmo background e a piramidação em um único genótipo anão geraria material que, ao ser cruzado com variedades elites, produziria híbridos F1 de porte normal e comerciais. A mesma abordagem também poderia ser utilizada para mutações recessivas, as quais poderiam ser estudadas com economia de espaço e tempo em MT, e aquelas que provarem ser atraentes seriam introgrididas em variedades de porte normal, fazendo o caminho inverso do que foi apresentado neste trabalho. Finalmente, no caso específico da introgressão das mutações hormonais e fotomorfogenéticas, uma última perspectiva, mas não menos importante, seria o emprego de MT em aulas práticas de fisiologia vegetal e genética do desenvolvimento. Desse modo, o ciclo de vida e a estrutura mínima requerida por MT possibilitariam seu cultivo e observação em salas de aula durante o semestre letivo. Adicionalmente, o emprego de mutantes hormonais e fotomorfogenéticos para o estudo desses eventos pode substituir com vantagem a necessidade de adquirir hormônios para aplicações exógenas e de criar condições artificiais de luz, o que impossibilita aulas práticas onde há limitações de orçamento.

2.3 Conclusão

A partir da introgressão das mutações fotomorfogenéticas e hormonais na cultivar Micro-Tom, o fenótipo das plantas bem como as análises desenvolvimentais realizadas permitem concluir que, apesar das mutações já presentes as quais conferem o nanismo em MT, essa cultivar é uma ferramenta passível de estudos de respostas controladas por fitocromo ou por hormônios.

Referências

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. **Ethylene in plant biology**, 2. ed. San Diego: San Diego Academic Press, 1992. 414 p.

ALBA, R.; VALENZANO, C.J.; KAYS, S.J.; CORDONNIER-PRATT, M-M.; PRATT, L.H. Genetic manipulation of phytochromes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): a novel approach to crop improvement. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 487, p. 93-98, 1999.

ALONSO-BLANCO, C.; KOORNNEEF, M. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 22-29, 2000.

ANDREWS, P.K.; FAHY, D.A.; FOYER, C.H. Relationships between fruit exocarp antioxidants in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) *high pigment-1* mutant during development. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 120, p. 519–528, 2004.

ARIE, T.; TAKAHASHI, H.; KODAMA, M.; TERAOKA, T. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**, v. 24, p.135–147, 2007.

ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E. R.; QIAN, Q.; KITAMO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science**, Washington, v. 309, p. 741-745, 2005.

BARRY, C.S.; FOX, E.A.; YEN, HC.; LEE, S.H.; YING, T.J.; GRIERSON, D.; GIOVANNONI, J.J. Analysis of the ethylene response in the *epinastic* mutant of tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 58–66, 2001.

BENSEN, R.J.; ZEEVAART, J.A.D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib1*, *gib2* and *gib3* tomato plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, p. 237-242, 1990.

BINDER, B.M.; O'MALLEY, R.; WANG, W.C.; MOORE, J.M.; PARKS, B.M.; SPALDING, E.P.; BLEECKER, A.B. *Arabidopsis* seedling growth response and recovery to ethylene. A kinetic analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 2913-2920, 2004.

BINO, R.J.; DE VOS, C.H.R.; LIEBERMAN, M.; HALL, R.D.; BOVY, A.; JONKER, H.H.; TIKUNOV, Y.; LOMMEN, A.; MOCO, S.; LEVIN, I. The light-hyperresponsive *high pigment-2^{dg}* mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. **New Phytologist**, London, v. 166, p. 427–438, 2005.

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

BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; FOUNTAIN, D. Lettuce seed germination and cytokinins: Their entry and formation. **Planta**, Berlin, v. 117, p. 145-152, 1974.

BOOKER, J.; AULDRIDGE, M.; WILLS, S.; MCCARTY, D.; KLEE, H.; LEYSER, O. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for synthesis of a novel plant signaling molecule. **Current Biology**, London, v. 14, p. 1232-1238, 2004.

BORLAUG, N.E. Contributions of conventional plant breeding to food production. **Science**, Washington, v. 219, p. 689–693, 1983.

BRADY, S.M.; MCCOURT, P. Hormone cross-talk in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 25–31, 2003.

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

CHAUDHURY, A.M.; LETHAM, S.; CRAIG, S.; DENNIS, E.S. *amp1* - A mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 907-916, 1993.

CHORY, J.; CHATTERJEE, M.; COOK, R.K.; ELICH, T.; FANKHAUSER, C.; LI, J.; NAGPAL, P.; NEFF, M.; PEPPER, A.; POOLE, D.; REED, J.; AND VITART, V. From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 22, p. 12066–12071, 1996.

CHORY, J.; PETO, C.A.; FEINBAUM, R.; PRATT, L.; AUSUBEL, F. *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. **Cell**, v. 58, p. 991-999, 1989.

CLELAND, R.E. The outer epidermis of Avena and maize coleoptiles is not a unique target for auxin in elongation growth. **Planta**, Berlin, v. 186 p. 75– 80, 1991.

COLLET, C.E.; HARBERD, N.P.; LEYSER, O. Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 553-562, 2000.

COOKSON, P.J.; KIANO, J.; FRASER, P.D.; ROMER, S.; SHIPTON, C.A.; SCHUCH, W.; BRAMLEY, P.M.; PYKE, K.A. Increases in cell elongation, plastid compartment size and translational control of carotenoid gene expression underly the phenotype of the *high pigment1* mutant of tomato. **Planta**, Berlin, v. 217, p. 896–903, 2003.

COWLING, R.J.; HARBERD, N.P. Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 1351-1357.

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

DAVIES, F. S. The navel orange. **Horticultural Reviews**, Westport, v. 8, p.129-180, 1986.

DROZDOVA, I.S.; BONDAR, V.V.; BUKHOV, N.G.; KOTOV, A.; KOTOVA, L.M.; MAEVSKAYA, S.N.; MOKRONOSOV, A.T. Effects of light spectral quality on morphogenesis and source–sink relations in radish plants **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 48, n. 4, p. 415-420, 2001.

EISENSTADT, F.A.; MANCINELLI, A.L. Phytochrome and seed germination: VI. Phytochrome and temperature interaction in the control of cucumber seed germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 53, p. 114-117, 1974.

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

FRIDMAN, E.; CARRARI, F.; LIU Y.S.; FERNIE, A.R.; ZAMIR, D.; Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. **Science**, Washington, v. 305: 1786-1789, 2004.

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

GALOCH, E.; ZELINSKA, M.; BURKACKA-LAUKAJTYS, E. The effect of decapitation on the levels of IAA and ABA in the lateral buds of *Betula pedula* Roth. **Acta physiologiae plantarum**, Berlin, v. 20, p. 399-403, 1998.

GEORGHIOU, K.; KENDRICK, R.E. The germination characteristics of phytochrome-deficient *aurea* mutant tomato seeds. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 82, 127–133, 1991.

GOLOVKO, T.K.; DYMOVA, O.V.; TABALENKOVA, G.N. The effect of light regime on source–sink relations in the shade-enduring *Ajuga reptans*. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 51, p. 604-608, 2004.

GRAY, R.A. Alteration of leaf size and shape and other changes caused by gibberellins in plants, **American Journal of Botany**, New York, v. 44, p. 674-682, 1957.

Halliday, K.J.; Fankhauser, C. Phytochrome-hormonal signalling networks. **New Phytologist**, London, v. 157, n. 3, p. 449-463, 2003.

HAY, A.; CRAFT, J.; TSIANTIS, M. Plant hormones and homeoboxes: bridging the gap? **Bioessay**, New York, v. 26, p. 395-404, 2004.

HAYES, A.B. Auxin-cytokinin effects in leaf blade hyponasty. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 139, n. 4, p. 385-389, 1978.

HICKS, G.R.; RAYLE, D.L.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, Washington, v. 254, p. 52–54, 1989.

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

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

ISAACSON, T.; RONEN, G.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 333-34, 2002.

JIMENEZ-GOMEZ, J.M.; ALONSO-BLANCO, C.; BORJA, A.; ANASTASIO, G.; ANGOSTO, T.; LOZANO, R.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Quantitative genetic analysis of flowering time in tomato. **Genome**, Ottawa, v. 50, n. 3, p. 303-15, 2007.

JONES, A.M.; IM, K.; SAVKA, M.A.; WU, M.; DEWITT, N.G.; SHILLITO, R.; BINNS, A.N. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. **Science**, Washington, v. 282, n. 5391, p. 1114 – 1117. 1998.

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

JONES, R.L. The physiology of gibberellin-induced elongation, **Plant Growth Substances**, New York, p. 188 - 195, 1979.

KEBROM, T.H.; BURSON, B.L.; FINLAYSON, S.A. Phytochrome B represses *Teosinte Branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n, 3, p. 1109-1117, 2006.

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

KENDRICK, R.E.; KERCKHOFFS, L.H.; VAN TUINEN, A.; KOORNNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Plant, Cell Environment**, Oxford, v. 20, p. 746-751, 1997.

KERCKHOFFS, L.H.J.; DE GROOT N.A.M.A.; VAN TUINEN A.; SCHREUDER M.E.L.; NAGATANI, A.; KOORNNEEF, M.; KENDRICK, R.E. Physiological characterization of exaggerated-photoresponse mutants of tomato. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 150, p. 578–587, 1997.

KERR, E.A. Identification of high-pigment, *hp*, tomatoes in the seedling stage. **Canadian Journal of Plant Science** Ottawa, v. 45, 104–105, 1965.

KIM, B.C.; SOH, M.C.; KANG, B.J.; FURUYA, M.; NAM, H.G. Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 441–456, 1996.

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

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

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

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C. J.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKEK, R.; ZABEL, P. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 131-141. 1993.

KOORNNEEF, M.; CONE, J.W.; DEKENS, R.G.; O'HERNE-ROBERS, E.G.; SPRUIT, C.J.P.; KENDRICK, R.E. Photomorphogenetic response of long-hypocotyl mutants of tomato. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 120, p. 153-165. 1985.

KRAEPIEL, Y.; AGNÈS, C.; THIERY, L.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E.; DELARUE, M. The growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hypocotyls in the light and in darkness differentially involves auxin. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p.1067-1074 , 2001.

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

LE BRIS, M.; MICHAUX-FERRIERE, N.; JACOB, Y.; POUPET, A.; BARTHE, P.; GUIGONIS, J.M.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Regulation of bud dormancy by manipulation of ABA in isolated buds of *rosa hybrida* cultured *in vitro*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 26, p. 273–281, 1999.

LERCARI, B.; LIPUCCI DI PAOLA, M. Photoregulation of seed germination of wild-type and of an *aurea*-mutant. of tomato. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 83, p. 256-268, 1991.

LEUBNER-METZGER, G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 758-763, 2001.

LI, C.J.; GUEVARA, E.; HERRERA, J.; BANGERTH, F. Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 94, p. 465–469, 1995.

LI, J.; CHORY, J. A putative leucine-rich receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. **Cell**, Cambridge, v. 90, p. 929-938, 1997.

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

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

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 777-786, 2002.

LIU, Y.; ROOF, S.; YE, Z.; BARRY, C.; VAN TUINEN, A.; VREBALOV, J.; BOWLER, C.; GIOVANNONI, J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, p. 9897–9902, 2004.

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G.J.; Dixon, M.S.; Garcia-Martinez, J.L. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 2037 – 2047, 2006.

MARTINEAU, B.; SUMMERFELT, K.R.; ADAMS, D.F.; DEVERNA, J.W. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. **Biotechnology**, New York, v. 13, p. 250-254, 1995.

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

MATILLA, A.J. Ethylene in seed formation and germination. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 10, p. 111-126, 2000.

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

MAXON-SMITH, J.W.; RITCHIE, D.B. A collection of near isogenic lines of tomato. Research tool of the future? **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 3, p. 20–25, 1982.

MCSTEEN, P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 353–374, 2005.

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

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

MENDA, N.; SEMEL, Y.; PELED, D.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, p. 861-872, 2004.

MOLAS, M.L.; KISS, J.Z.; CORRELL, M.J. Gene profiling of the red light signalling pathways in roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3217-3229. 2006.

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

MORRIS, S.E.; TURNBULL, C.G.N.; MURFET, I.C.; BEVERIDGE, C.A. Mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 1205–1213, 2001.

MUELLER, L.A.; SOLOW, T.H.; TAYLOR, N.; SKWARECKI, B.; BUELS R.; BINNS, J.; LIN, C.W.; WRIGHT, M.H.; AHRENS, R.; WANG, Y.; HERBST, E.V.; KEYDER, E.R.; MENDA, N.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. The SOL Genomics Network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond, **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 1310-1317, 2005.

MULTANI, D.S.; BRIGGS, S.P.; CHAMBERLIN, M.A.; BLAKESLEE, J.J.; MURPHY, A.S.; JOHAL, G.S. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. **Science**, Washington, v. 302, p. 81–84, 2003.

Muramoto, T.; Kami, C.; Kataoka, H.; Iwata, N.; Linley, P.J.; Mukougawa, K.; Yokota, A.; Kohchi, T. The tomato photomorphogenetic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 46, p. 661–665, 2005.

MUSTILLI, A.C.; FENZI, F.; CILIENTO, R.; ALFANO, F.; AND BOWLER, C. Phenotype of the tomato *high pigment-2* mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *DEETIOLATED1*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 145–157, 1999.

NEFF, M.M.; FANKHAUSER, C.; CHORY, J. Light: an indicator of time and place. **Genes and Development**, New York, v. 14, n. 3, p. 257-71, 2000.

NIKOLIĆ, R.; MITIĆ, N.; MILETIĆ, R.; NEŠKOVIĆ, M. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 25, n. 3, p. 187-194, 2006.

OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 133-144, 2006.

OKAMURO, J.K.; SZETO, W.; LOTYS-PRASS, C.; JOFUKU, K.D. Photo and hormonal control of meristem identity in the *Arabidopsis* flower mutants *apetala2* and *apetala1*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 37–47, 1997.

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

PERES, L.E.P.; CARVALHO, R.F.; ZSÖGÖN, A.; BERMÚDEZ-ZAMBRANO, O. D.; ROBLES, W.G.R.; TAVARES, S. Grafting of tomato mutants onto potato rootstocks: an approach to study leaf-derived signaling on tuberization. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, p. 680-688, 2005.

PETERS, J.L.; VAN TUINEN, A.; ADAMSE, P.; KENDRICK, R.E.; KOORNNEEF, M. High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 134, p. 661-666, 1989.

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

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**, Washington, v. 125, p. 1979–1989, 1998.

POOLE, I.; WEYERS, J.D.B.; LAWSON, T.; RAVEN, J.A. Variations in stomatal density and index: Implications for paleoclimatic reconstructions, **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p.705– 712, 1996.

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

QUILES, M.J.; CUELLO, J.; SABATER, B. Phytochrome and hormone control of polypeptides synthesized by chloroplasts of senescent barley leaves. **Revista Española de Fisiología**, Barcelona, v. 46, n. 3, p. 279-282, 1990.

RAMPEY, R.A.; LECLERE, S.; KOWALCZYK, M.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; BARTEL, B. A family of auxin-conjugate hydrolases that contribute to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 978-988, 2004.

RAYLE, D.L.; NOWBAR, S.; CLELAND, R.E. The epidermis of the pea epicotyl is not a unique target for auxin-induced growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 449– 451, 1999.

REID, J.B. Plant hormone mutants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.12, p. 207-226, 1993.

RICK, C.M. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species. **Hilgardia**, Berkeley, v. 42, p. 493-510, 1974.

RICK, C.M. (1973) Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In: Hollaender, A; Srb, A. (Ed.). **Genes, Enzymes, and Populations**. New York: Plenum, 1973. p. 255-269.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 40–54, 2006.

RIOU-KHAMLICHI, 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.

ROITSCH, T.; EHNEß, R. Regulation of source/sink relations by cytokinins. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, p. 359-267, 2000.

RUPP, H-M.; FRANK, M.; WERNER, T.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. The **Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 557-563, 1999.

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

SATLER, S.O.; KENDE H. Ethylene and the growth of rice seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 79, p. 194–198, 1985.

SCHEPENS, P.; DUEK, C.; FANKHAUSER, C. Phytochrome-mediated light signalling in *Arabidopsis*, **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, p. 564–569, 2004.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station**, Circular S-370, v. 370, p. 1-6, 1989.

SERRANI, J.C.; SANJUÁN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. GIBBERELLIN Regulation of Fruit-Set and Growth in Tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.145, n. 1, p. 246-57, 2007a.

SERRANI, J.C.; FOS, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. Effect of Gibberellin and Auxin on Parthenocarpic Fruit Growth Induction in the cv Micro-Tom of Tomato. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. p. 211-221, 2007b.

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

SIRIWITAYAWAN, G.; GENEVE R.L.; DOWNIE, A.B. Seed germination of ethylene perception mutants of tomato and *Arabidopsis*. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 13, n. 4, p. 303-314, 2003.

STEVENS, M.A.; RICK, C.M. Genetic and breeding In: Atherton, J.G.; Rudich, J. (Ed.). **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986, p. 35-109.

STIRK, W.A.; GOLD, J.D.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; VAN STADEN, J. Changes in endogenous cytokinins during germination and seedlings establishment of *Tagetes minuta*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47; p. 1-7, 2005.

TAL, M.; IMBER, D.; EREZ, A.; EPSTEIN, E. Abnormal stomatal behavior and hormonal imbalance in *flacca*, a wilted mutant of tomato: V. Effect of abscisic acid on indoleacetic acid metabolism and ethylene evolution. **Plant Physiology**, Rockville, v. 63, p. 1044–1048, 1979.

TAYLOR, I. B. Biosystematics of the tomato. In: Atherton, J.G.; Rudich, J. (Eds.) **The tomato crop: a scientific basis for improvement**. London: Chapman and Hall, 1986. p. 1-34.

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

TERRY, M.J.; KENDRICK, R.E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient *aurea* and *yellow-green-2* mutants of tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 143-152, 1999.

THOMPSON, A.E. A comparison of fruit quality constituents of normal and high pigment tomatoes. **Proceedings of American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 78, p. 464–473, 1962.

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

TONSOR, S.J.; ALONSO-BLANCO, C.; KOORNNEEF M. Gene function beyond the single trait: natural variation, gene effects, and evolutionary ecology in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 28, p. 2–20, 2005.

TORRES, C.A.; ANDREWS, P.K.; DAVIES, N.M. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 9, p.1933-1947, 2006.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT. **A software for plant disease severity assessment**. In: 8th International Congress of Plant Pathology, 2003, Christchurch, New Zealand, 2003. p. 105.

VAN TUINEN, A.; HANHART, C.J.; KERCKHOFFS, L.H.J.; NAGATANI, A.; BOYLAN, M.T.; QUAIL, P.H.; KENDRICK, R.E.; KOORNNEEF, M. Analysis of Phytochrome-deficient *yellow-green-2* and *aurea* mutants tomato. **The Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 173-182, 1996.

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

VANDENBUSSCHE, F.; HABRICOT, Y.; CONDIFF, A.S.; MALDINEY, R.; STRAETEN, D.V.; AHMAD, M. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 428-41, 2007.

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

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

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

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; AND SCHMÜLLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in regulating shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2532–2550, 2003.

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

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

YAMAMOTO, N.; TSUGANE, T.; WATANABE, M.; YANO, K.; MAEDA, F.; KUWATA, C.; TORKI, M.; BAN, Y.; NISHIMURA, S.; SHIBATA, D. Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. **Gene**, Amsterdam, v. 356, p. 127–134, 2005.

YEN, H.; SHELTON, A.; HOWARD, L.; VREBALOV, J.; AND GIOVANNONI, J. The tomato *high-pigment* (*hp*) locus maps to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 95, p. 1069-1079, 1997.

3 ALONGAMENTO E ACÚMULO DE ANTOCIANINAS EM HIPOCÓTILOS DE TOMATEIRO COMO UMA RESPOSTA HORMONAL E/OU FOTOMORFOGENÉTICA. ESTUDOS COM MUTANTES E DUPLOS MUTANTES EM CINCO CLASSES HORMONAIS E FITOCROMO.

Resumo

No presente trabalho foram analisados o alongamento e o acúmulo de antocianinas em hipocótilos de mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Micro-Tom) com alterações na biossíntese ou resposta a fitocromo (phy), bem como auxina (AUX), citocinina (CK), ácido abscísico (ABA), etileno (ET) e giberelina (GA). As interações entre hormônios e luz foram testadas via tratamentos exógenos em mutantes fotomorfogenéticos e observação de mutantes hormonais variando a condição de luz, além de análises utilizando duplos mutantes combinando mutações hormonais e fotomorfogenéticas. Nos tratamentos exógenos, o acúmulo de antocianinas no hipocótilo foi promovido por CK e ABA e bastante inibido por GA. Coerentemente, houve uma redução no acúmulo de antocianinas no mutante deficiente em ABA (*notabilis* ou *not*) e uma redução muito acentuada no mutante hipersensível à GA (*procera* ou *pro*). Foi observado um grande acúmulo de antocianinas no mutante pouco sensível à AUX (*diageotropica* ou *dgt*), o que não teve relação com os tratamentos exógenos, mas que é coerente com a sugestão de que esse mutante possui uma resposta ao balanço AUX/CK voltado para CK. Aplicação de ET também mostrou ser inibitório, mas somente no mutante *phy*⁺ (*high pigment1* ou *hp1*), o qual normalmente possui um elevado conteúdo de antocianinas nos hipocótilos. Todas as classes hormonais utilizadas exogenamente inibiram, com exceção de GA, o alongamento do hipocótilo no escuro. Embora os tratamentos exógenos tenham tido pouco efeito na luz, mutantes afetando diferentes classes hormonais promoveram ou inibiram o alongamento do hipocótilo nessa condição. Entre tais mutantes, as maiores inibições na luz foram observadas no superprodutor de ET (*epinastic* ou *epi*) e no pouco sensível à CK (*bushy root* ou *brt*), e as maiores promoções no hipersensível à GA e no deficiente em ABA (*sitiens* ou *sit*). No escuro, o único mutante que apresentou alongamento do hipocótilo superior a MT foi o mutante deficiente na biossíntese de phy (*phy*⁻) (*aurea* ou *au*). Os mutantes que mais inibiram o alongamento no escuro foram o superprodutor de ET e os pouco sensíveis à AUX ou CK. Os duplos mutantes combinado *phy*⁻ com alterações em AUX, GA, ET e ABA mostraram um fenótipo aditivo ou sinérgico, o que indica vias paralelas na sinalização, tanto no acúmulo de antocianinas quanto no alongamento do hipocótilo. Contudo, no caso da mutação afetando sensibilidade à CK houve relação de epistasia, sendo essa epistática a *phy*⁻ no alongamento do hipocótilo, embora tenha sofrido epistasia de *phy*⁻ no acúmulo de antocianinas. Em conjunto, esses resultados sugerem que, embora a maioria das classes hormonais testadas possa afetar o alongamento do hipocótilo e o acúmulo de antocianinas, seus efeitos, com exceção da CK, provavelmente são gerados por uma via de transdução de sinal diferente do sinal luminoso.

Palavras-chave: Fitocromo; Hormônios; Alongamento do hipocótilo; Acúmulo de antocianinas.

3 TOMATO HYPOCOTYL ELONGATION AND ANTHOCYANIN ACCUMULATION AS A HORMONAL AND/OR PHOTOMORPHOGENIC RESPONSE. ANALYSIS OF MUTANT AND DOUBLE MUTANTS IN FIVE HORMONAL CLASSES AND PHYTOCHROME

Abstract

In this work we analysed hypocotyl elongation and anthocyanin accumulation in tomato mutants (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Micro-Tom) with altered biosynthesis or response to phytochrome (phy), auxin (AUX), cytokinin (CK), gibberellin (GA), abscisic acid (ABA) and ethylene (ET). We used the following approaches: i) exogenous hormone application in photomorphogenic mutants; ii) cultivation of hormonal mutants under light and dark conditions; iii) analysis of double mutants (photomorphogenic-hormonal). Anthocyanin accumulation was promoted by exogenous CK and ABA and inhibited by GA. This is in accordance with the reduced anthocyanin accumulation in the ABA deficient mutant (*not*) and in the GA hypersensitive mutant (*pro*). Although the *diageotropica* (*dgt*), auxin-insensitive mutant, showed a high anthocyanin accumulation, exogenous auxin did not supported a role for this hormone in anthocyanin accumulation. On the other hand, this could be due to a low auxin-to-cytokinin ratio presented by *dgt*. Data from mutants with altered metabolism and sensitivity of ethylene, *epinastic* (*epi*) and *Never ripe* (*Nr*) respectively, and from plants treated with this hormone suggest a limited role of ethylene in the anthocyanin biosynthesis. Exogenous AUX, CK, ABA and ET inhibited the hypocotyl elongation. This is coherent with the promotion of hypocotyl elongation in *dgt* and *sit* mutants under light conditions and inhibition of hypocotyl elongation in the *epi* mutant in the light and dark. On the other hand, GA promoted the hypocotyl elongation corroborating the same effect seen in *pro*. The *brt* mutant showed a reduced hypocotyl elongation in light and dark conditions, which contradicts the effect of exogenous cytokinin. The phytochrome-deficient *aurea* (*au*) mutant was the only one to show an enhanced hypocotyl elongation in the dark compared to the wild type (MT). The combination between photomorphogenic and hormonal mutants (double mutants) showed additive (*au epi*, *au Nr*, *au dgt* e *au sit*), synergistic (*au pro*) and epistatic (*au brt*) interactions considering the anthocyanin accumulation and hypocotyl elongation. Synergistic interaction was observed in the elongation hypocotyl of the *au dgt* and *au sit* double mutants. These results indicate that phy and CK may share some signaling/metabolic pathways in the control of anthocyanin accumulation and hypocotyl elongation. On the other hand, our data do not support an interaction between phy and the hormones AUX, ET, ABA and GA in the control of hypocotyls elongation or anthocyanin accumulation.

Keywords: Phytochrome; Hormones; Hypocotyl elongation; Anthocyanin accumulation

3.1 Introdução

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento vegetal, eventos que desempenham um papel importante para seu estabelecimento no ambiente (KENDRICK; KRONENBERG, 1994), como o alongamento e o acúmulo de antocianinas nos hipocótilo, são fortemente controlados pela luz (CHALKER-SCOTT, 1999; SYMONS; REID, 2003). Dessa forma, numerosos trabalhos têm avaliado a atividade de fotorreceptores no controle de ambos processos (PETERS et al., 1989; KERCKHOFFS et al., 1997; NEFF; CHORY, 1998; ALOKAM et al., 2002; HUSAINID et al., 2007; VANDENBUSSCHE et al., 2007). Além disso, tratamentos com hormônios vegetais podem alterar tanto o alongamento do hipocótilo (PEREZ et al., 1974; CARY; LIU; HOWELL, 1995; SU; HOWELL, 1995; COWLING; HARBERD, 1999; COLLET; HARBERD; LEYSER, 2000) quanto a biossíntese de antocianinas (PEREZ et al. 1974; DEIKMAN; HAMMER, 1995; VANDENBUSSCHE et al., 2007) de modo semelhante aos efeitos promovidos pela luz. Sendo assim, hipóteses têm sido levantadas sobre a interação entre luz e hormônios no controle da fotomorfogênese. Tais hipóteses dizem respeito à possibilidade dos hormônios fazerem parte da mesma via de transdução de sinal iniciada pelos fotorreceptores ou, alternativamente, partilharem algumas das moléculas dessa via. Na tentativa de responder essas questões, o uso de mutantes com alterações no metabolismo/sensibilidade a fotorreceptores e hormônios vegetais torna-se uma ferramenta valiosa (VON ARNIM; DENG, 1996). Além disso, interações entre hormônio e fotomorfogênese podem ser testadas pela observação do fenótipo de duplos ou combinações múltiplas de mutantes nesses dois tipos de moduladores do desenvolvimento.

Grande parte dos trabalhos envolvendo o uso de mutantes é realizada em *Arabidopsis thaliana*, o modelo genético mais utilizado. Contudo, algumas plantas de interesse agrônômico direto também provaram serem bons modelos genéticos, como o arroz (*Oryza sativa* L.), o milho (*Zea mays* L.), a ervilha (*Pisum sativum* L.) e o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L.). Essa última espécie é um modelo complementar a *Arabidopsis* para estudar respostas fotomorfogenéticas, visto que, por exemplo, a produção de antocianinas em tomateiro ocorre de maneira estritamente dependente da luz, o que provavelmente não é o caso de *Arabidopsis*

(CHORY et al. 1994). Além disso, enquanto em *Arabidopsis* a família gênica que codifica as diferentes apoproteínas do fotorreceptor fitocromo é representada pelos genes *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*, em tomateiro essa família é composta por *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* e *PHYF* (PRATT et al., 1997).

No que diz respeito à disponibilidade de mutantes, esses são descritos em tomateiro para alterações na via de transdução do sinal da luz (KOORNNEEF et al., 1985; KENDRICK et al., 1997), bem como no metabolismo/sensibilidade à auxina (HICKS; RAYLE; LOMAX, 1989; KELLY; BRADFORD, 1986; OH et al., 2006), citocinina (PINO-NUNES, 2005), ácido abscísico (TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000; BURBIDGE et al., 1999), giberelinas (JONES, 1987; BENSEN; ZEEVAART, 1990; KOORNNEEF et al., 1990), etileno (FUJINO et al., 1988; WILKINSON et al., 1995), brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999; KOKA et al., 2000; MONTOYA et al., 2002) e ácido jasmônico (HOWE et al., 1996; HOWE; RYAN, 1999; LI; LI; HOWE 2001). Assim como *Arabidopsis*, o tomateiro também possui uma série de mutantes afetando o acúmulo de antocianinas (ATANASSOVA et al., 2001). Um fato interessante, porém, é que a engenhosa estratégia de se isolar mutantes em antocianinas pela observação da testa das sementes em *Arabidopsis* (KOORNNEEF, 1990) não precisou ser realizada para tomateiro, já que o tamanho de seus hipocótilos facilita sua observação a olho nu, além de também facilitar a obtenção de material suficiente para dosagens.

Uma das limitações presente em tomateiro, e outros modelos vegetais, para estudos integrados é o fato dos vários mutantes isolados estarem normalmente distribuídos em diferentes backgrounds genéticos. Contudo, em um estudo prévio (Capítulo 1), foram introgrididas mutações em tomateiro correspondentes às principais classes hormonais bem como mutantes com alterações na via de transdução do sinal da luz em uma única cultivar, Micro-Tom (MT), a qual tem a vantagem de possuir porte reduzido e ciclo de vida rápido, 70-90 dias (SCOTT; HARBAUGH, 1989; MEISSNER et al., 1997). No referido estudo, foi evidenciado que as alterações genéticas que levam ao porte reduzido e ao ciclo rápido dessa cultivar não impedem seu uso para o estudo de eventos desenvolvimentais afetados por hormônios e pela luz (Capítulo 1).

No presente trabalho, tomamos vantagem da coleção de mutantes hormonais e fotomorfogenéticos em um só background genético mencionada acima (Capítulo 1) para

o estudo da interação entre hormônios e luz no alongamento e no acúmulo de antocianinas em hipocótilos de tomateiro. Para tal, três abordagens foram utilizadas: i) tratamentos exógenos utilizando diferentes classes hormonais em mutantes fotomorfogénéticos, ii) observação de hipocótilos de mutantes hormonais crescidos na luz e no escuro, iii) observação de duplos mutantes combinando mutações hormonais e fotomorfogénéticas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Material vegetal

Foram utilizados 7 mutantes hormonais recessivos e 1 dominante, bem como 2 mutantes fotomorfogénéticos recessivos de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. syn. *Solanum lycopersicum* L.) todos no background da cv Micro-Tom (Tabela 1), obtidos em trabalhos anteriores (Capítulo 1). Tais genótipos foram utilizados para construção de 6 duplos mutantes fotomorfogénéticos-hormonais (Figuras 1 e 8).

3.2.1.2 Cultivo e construção de duplos mutantes

Sementes dos mutantes hormonais e fotomorfogénéticos foram semeadas em bandejas contendo uma mistura na proporção de 1:1 de substrato comercial (Plantmax HT, Eucatex) com vermiculita expandida, suplementado com 1g/L de NPK 10:10:10 e 4g/L de calcário. Após 10 dias, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade para 150mL, com as mesmas misturas para substrato. Após o florescimento, pólenes foram retirados dos mutantes fotomorfogénéticos e postos para polinizar flores jovens emasculadas dos mutantes hormonais. As sementes geradas (F1) foram semeadas e as plantas resultantes foram deixadas para se autofecundar e obter a geração F2, na qual foram triados duplos mutantes. Para o duplo com a mutação dominante (*Nr*) foi realizado um teste de progênie para seleção de homozigotos. Para coleta de sementes, frutos maduros foram colhidos e a polpa contendo as sementes fermentadas durante 12 horas na presença de um pouco de água e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) liofilizada (Fermix). Posteriormente, as sementes foram lavadas e secas em ambiente ventilado e sombreado.

3.2.1.3 Determinação de antocianinas e medidas do comprimento do hipocótilo

Sementes foram postas para germinar no escuro em água destilada até a protrusão da radícula, sendo em seguida transferidas para luz, ou permanecidas no escuro, e submetidas a tratamentos com soluções hormonais: 10^{-7} a 10^{-4} M de auxina (ácido naftalenoacético, ANA, SIGMA), citocinina (Thidiazuron, TDZ, Bayer CropScience) e ácido abscísico (ABA, SIGMA), 10^{-6} a 10^{-3} M de giberelina (GA_3 , ProGibb, SUMITOMO) e 10^{-7} a 10^{-4} g/L de etileno (ácido cloroetil fosfônico, CEPA ou Ethrel, Bayer CropScience), além do controle sem hormônios. Após 10 dias de cultivo, foi medido, com auxílio de um paquímetro digital, o comprimento do hipocótilo na luz e escuro, utilizando-se 20 plântulas por tratamento. A extração e quantificação de antocianinas foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Peters et al., (1989) em plantas crescidas na luz. Para determinação de antocianinas, utilizaram-se três repetições de 5 hipocótilos cortados do colo até a base dos cotilédones para cada tratamento.

3.2.1.4 Tratamentos com luz

O acúmulo de antocianinas e o comprimento do hipocótilo foram avaliados após a permanência das plântulas durante 10 dias em caixas gerbox transparentes em fotoperíodo de 16 horas sob 3 lâmpadas fluorescentes (40W - Luz do dia especial - $55 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) em uma sala de crescimento a uma temperatura de 25°C . Para obtenção do escuro, as plântulas foram crescidas em caixas gerbox preta sob as mesmas condições de temperatura.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Obtenção e fenótipo dos duplos mutantes hormonais-fotomorfogenéticos

O cruzamento entre *au* e os mutantes hormonais geraram em F2 duplos mutantes carregando ao mesmo tempo deficiência na biossíntese do fitocromo (*phy*⁻) e alterações na biossíntese e/ou sensibilidade a hormônios (Figura 1 e Tabela 1). Todos os duplos mutantes apresentaram um fenótipo aditivo, combinado o aspecto clorótico de *au* com aspectos conhecidos de cada mutante hormonal. Por exemplo, em *au dgt* pode-se observar a hiponastia cotiledonar (Figura 1C) devido à baixa sensibilidade à AUX de *dgt*.

Em *au epi* ocorreu inibição do alongamento do hipocótilo (Figura 1B) devido a superprodução de ET de *epi*. Em *au pro* é evidente o alongamento exagerado do hipocótilo (Figura 1D) devido ao aumento na sensibilidade à GA em *pro* somado ao proeminente alongamento já presente em *au*. Em *au Nr* observa-se ausência do encurtamento da raiz na presença de ET (Figura 1A) e atraso severo na maturação do fruto devido à baixa sensibilidade ao ET de *Nr*. Em *au sit* as plantas adultas apresentaram um murchamento evidente (Figura 1E) devido à deficiência na biossíntese de ABA de *sit*. O fenótipo aditivo ou sinérgico (e.g. alongamento do hipocótilo de *au pro*) das interações entre hormônio e fitocromo sugere que participem de vias distintas de transdução de sinais (Figura 8). Contudo, chama atenção o fenótipo bastante debilitado de plantas adultas de *au brt* (Figura 1F), além do fato da mutação *brt* praticamente suprimir o efeito de *au* no alongamento do hipocótilo. Essa epistasia de *brt* sobre *au* sugere uma via comum entre CKs e phy. Essas sugestões foram testadas com a quantificação de antocianinas e medições precisas do alongamento dos hipocótilos dos simples e duplos mutantes de tomateiro, como se verá adiante.

Figura 1 – Fenótipo dos duplos mutantes fotomorfogênicos-hormonais na cv MT. Note que os duplos mutantes apresentaram um fenótipo aditivo, ou em alguns casos sinérgico (Figura 8), combinando o aspecto clorótico da deficiência de fitocromo (*au*) com aspectos de cada mutação hormonal. **A)** Falha do etileno exógeno (100 ppm de Ethrel) em inibir o alongamento radicular no duplo mutante *au Nr*, sendo esse um fenótipo típico do mutante pouco sensível a essa classe hormonal (*Nr*). **B)** Plântulas com 15 dias do duplo *au epi* combinando o aspecto clorótico de *au* com a inibição do alongamento do hipocótilo e a epinastia do cotilédone do mutante superprodutor de etileno (*epi*). **C)** Plântulas com 15 dias do duplo mutante *au dgt* apresentando cotilédones hiponásticos, característico de baixa sensibilidade à auxina. **D)** Interação sinérgica no alongamento do hipocótilo devido à soma dos efeitos da mutação *au* com a hipersensibilidade a giberelina do mutante *pro*. **E)** Fenótipo aditivo do duplo mutante *au sit*, o qual combina o aspecto clorótico de *au* com o aspecto murcho, devido à deficiência de ácido abscísico, de *sit*. **F)** Fenótipo bastante debilitado do duplo mutante *au brt*, resultado do efeito da deficiência em phy de *au* somada a baixa sensibilidade à CK de *brt*

Tabela 1 - Mutantes hormonais e fotomorfogênicos utilizados. Todos os mutantes estão no background da cv Micro-Tom (Capítulo 1)

Mutantes	Efeito
<i>diageotropica (dgt)</i>	AUX ⁻
<i>bushy root (brt)</i>	CK ⁻
<i>epinastic (epi)</i>	ET ⁺
<i>Never ripe (Nr)</i>	ET ⁻
<i>sitiens (sit)</i>	ABA ⁻
<i>notabilis (not)</i>	ABA ⁻
<i>procera (pro)</i>	GA ⁺
<i>aurea (au)</i>	PHY ⁻
<i>high pigment1 (hp1)</i>	PHY ⁺

AUX⁻ = baixa sensibilidade à auxina, CK⁻ = baixa sensibilidade à citocinina, ET⁺ = produção exagerada de etileno, ET⁻ = baixa sensibilidade ao etileno, GA⁺ = alta sensibilidade à giberelina, ABA⁻ = deficiência na biossíntese de ácido abscísico, phy⁻ = deficiência na biossíntese de fitocromo, phy⁺ = respostas exageradas à luz (phy). A descrição do fenótipo dos mutantes e a alteração da função gênica estão descritas no Capítulo 1

3.2.2.2 Acúmulo de antocianinas em mutantes hormonais

Afim de verificar a alteração hormonal que poderia afetar o acúmulo de antocianinas, plântulas germinadas dos mutantes hormonais (Tabela 1) foram cultivados durante 10 dias sob condições que levem ao acúmulo desses pigmentos (16 h de fotoperíodo, 55 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR). Também foram utilizados os mutantes *au* (deficiente na percepção da luz) e *hp1* (respostas exageradas à luz), os quais são bem conhecidos por reduzir e aumentar o acúmulo de antocianinas, respectivamente (KOORNNEEF et al., 1985; PETERS et al. 1989; KENDRICK et al., 1997; Capítulo 1). Entre os mutantes hormonais testados, o pouco sensível à AUX, *dgt*, foi o único superior ao controle MT, embora seu conteúdo de antocianinas tenha sido menor que aquele apresentado por *hp1* (Figura 2). O aumento dos níveis de antocianinas no hipocótilo de *dgt* foi descrito inicialmente por Zobel (1972), porém, os fatores envolvidos nessa resposta ainda permanecem pouco elucidados, bem como o papel da AUX nesse processo.

Três genótipos reduziram mais acentuadamente o conteúdo de antocianinas quando comparado a MT: *not* (deficiência na biossíntese de ABA), *Nr* (pouco sensível

ao ET) e *pro* (muito sensível à GA), embora nenhuma dessas mutações reduziu tão severamente quanto *au* (Figura 2). A redução em *Nr* poderia indicar um importante papel para o ET no acúmulo, porém, o mutante que apresenta alta produção desse hormônio, *epi*, praticamente não diferiu de MT (Figura 2). Esses resultados sugerem que a atividade do ET na síntese desses pigmentos em tomateiro é pouco expressiva, e que a diminuição da resposta em *Nr* pode ser um efeito desenvolvimental indireto. Entretanto, a redução em *not* e *pro* indica a participação do ABA e GA na síntese desses flavonóides (Figura 2). Em *pro*, a redução significativa nos níveis de antocianinas já havia sido observada em folhas jovens por Van Tuinen et al., (1999). O fato da deficiência de ABA ter o mesmo efeito do excesso de resposta a GA pode indicar que o acúmulo de antocianinas em tomateiro está sob o controle de um balanço ABA/GA, como sugerido para a germinação (WHITE et al., 2000).

A pouca diferença entre *brt* e MT poderia indicar um papel limitado da citocinina no acúmulo de antocianinas (Figura 2). Porém, além de já ser conhecido o efeito promotor da CK em tomateiro (MUSTILLI et al. 1999), Pino-Nunes (2005) evidenciou que a aplicação de CKs em MT e *brt* provoca um acúmulo de antocianinas proporcional à dose em MT, não sendo essa resposta observada em *brt*.

Figura 2 – Acúmulo de antocianinas em hipocótilos dos mutantes hormonais e fotomorfogenéticos. As dosagens foram realizadas em 3 repetições de 5 hipocótilos retirados de plântulas crescidas durante 10 dias sob luz. A descrição de cada mutante encontra-se na Tabela 1

3.2.2.3 Acúmulo de antocianinas em mutantes fotomorfogênicos na presença de hormônios exógenos

Baseado nas respostas observadas nos mutantes hormonais, foram quantificadas antocianinas em hipocótilos de *au* e *hp1* na presença de hormônios exógenos. Procurou-se utilizar o genótipo que acumula exageradamente antocianinas na presença de hormônios que provavelmente possuem efeito oposto. Desta forma, *hp1* foi crescido em soluções de GA, de acordo com a redução em *pro* (Figura 2), e em AUX, devido ao exagerado acúmulo em *dgt* (Figura 2). Por outro lado, o mutante *au*, o qual reduz severamente as antocianinas, permaneceu na presença de hormônios que parecem ser promotores desse pigmento, como ABA, devido ao decréscimo em *not* (Figura 2), e CK, devido a informações prévias (MUSTILLI et al. 1999; PINO-NUNES, 2005). Como os mutantes *epi* e *Nr* apresentaram diferenças com relação ao controle (Figura 2), o etileno exógeno também foi utilizado para *hp1* e *au*.

Em todas as aplicações exógenas, chama a atenção o fato de nenhuma classe hormonal, e em nenhuma concentração testada, ser capaz de recuperar o fenótipo dos mutantes *au* ou *hp1*, sendo, portanto, todas as curvas de dose-resposta paralelas as de MT (Figura 3 e 4A e B). Quanto aos resultados específicos, o tratamento de *hp1* com ANA não provocaram redução no acúmulo de antocianinas (Figura 3A), como esperado pela observação de *dgt* (Figura 2). Essa resposta sugere que outro fator associado à atividade da AUX possa modular a biossíntese de antocianinas, como, por exemplo, um balanço entre esse hormônio e CK. De fato, é sabido que o balanço AUX/CK controla uma série de respostas nas plantas (COENEN; LOMAX, 1997; ECKARDT, 2003). Suportando essa proposta está a elevação dos níveis de antocianinas em MT proporcional ao aumento da concentração de CK, embora o mesmo não tenha sido observado no mutante *au* (Figura 3B). Coerentemente com o fato do mutante deficiente em ABA, *not*, ter acumulado menos antocianinas (Figura 2), tratamentos de MT com ABA provocaram acréscimo até 10^{-6} M, e se elevou substancialmente em 10^{-4} M. Em *au*, a elevação nos níveis de antocianinas ocorreu até 10^{-6} M, permanecendo constante até 10^{-4} M (Figura 3C). A inibição do acúmulo de antocianinas por GA, sugerida pela observação do mutante *pro* (Figura 2), fica evidente na curva de dose-resposta apresentada na figura 3D tanto para MT quanto para *hp1*.

O efeito do ET parece ser inespecífico no acúmulo de antocianinas devido aos mutantes *epi* e *Nr* não possuírem respostas opostas evidentes, quando comparadas com MT, como seria esperado (Figura 2). É interessante notar, contudo, que em *hp1* houve uma redução do acúmulo de antocianinas proporcional ao aumento da concentração de ET (Figura 4A). Porém, as curvas sem alterações significativas observadas em MT (Figuras 4A-C) e em *au* (Figura 4B) indicam que as respostas em *hp1* podem ser devido a efeitos desenvolvimentais indiretos presentes nesse mutante. O fato do mutante *Nr* (pouco sensível a ET) possuir uma curva de dose-resposta semelhante a MT reforça a hipótese de que o ET tem pouca função no acúmulo de antocianinas (Figura 4C).

Figura 3 - Acúmulo de antocianinas em hipocótilos de MT (controle) e dos mutantes fotomorfogênicos (*au* e *hp1*) tratados com hormônios exógenos. **A)** Aplicação de auxina, ácido naftaleno acético (ANA). **B)** Aplicação de citocinina, thidiazuron (TDZ). **C)** Aplicação de ácido abscísico (ABA). **D)** Aplicação de giberelina, ácido giberélico (GA₃). Condições de medição iguais as da Figura 2

Figura 4 - Acúmulo de antocianinas em hypocótilos de MT e de mutantes fotomorfogenéticos e hormonais tratados com etileno (Ethrel) exógeno. **A)** Aplicação de etileno no mutante com excesso de resposta à luz (*hp1*). **B)** Aplicação de etileno no mutante com deficiência de fitocromo (*au*). **C)** Aplicação de etileno no mutante insensível a essa classe hormonal (*Nr*). Condições de medição iguais as das Figuras 2 e 3

3.2.2.4 Interação entre luz e hormônios no acúmulo de antocianinas

Até aqui, nossos resultados têm mostrado que pelo menos três classes hormonais podem estar envolvidas no acúmulo de antocianinas no hipocótilo de tomateiro, GA, ABA e CK. Entretanto, a luz é o fator mais evidente nessa resposta. Dessa forma, para verificar se fitocromo e hormônios partilham vias comuns na indução ou repressão da biossíntese de antocianinas, um terceiro experimento foi desenvolvido utilizando duplos mutantes fotomorfogênicos-hormonais. A figura 5 mostra que a presença da mutação *phy⁻* (*au*) levou a uma diminuição do nível de antocianinas em todas as combinações com mutações hormonais. Porém, valores menores que *au* foram encontrados apenas em *au pro* e *au brt*. Os níveis extremamente reduzidos em *au pro* indicam um efeito sinérgico (Figura 8), onde ambas mutações contribuem para uma diminuição do acúmulo de antocianinas, porém em vias diferentes. Os níveis intermediários de antocianinas apresentados pelos duplos *au dgt*, *au sit*, *au Nr* e *au epi* indicam efeito aditivo (Figura 8), o qual também é interpretado como a somatória de vias independentes de sinalização. No caso específico do duplo *au brt*, como o mutante simples *brt* não levou a diminuição nos níveis dessa substância, a extrema redução apresentada pelo duplo mutante não pode ser considerada como efeito sinérgico e sim aditivo ou epistático (Figura). Se considerarmos que CK exógena leva ao acúmulo de antocianinas em MT, mas praticamente não tem efeito no mutante *au* (Figura 3B), o fenótipo do duplo mutante *au brt* pode indicar que as vias de transdução de sinal de *phy* e CK são interdependentes. Nesse caso, a CK seria incapaz de estimular o acúmulo de antocianinas se há pouca percepção da luz e a combinação de deficiência de ambos levaria a um fenótipo sinérgico de extrema deficiência de antocianinas, ainda que a relação provavelmente seja de epistasia.

Figura 5 - Acúmulo de antocianinas em hipocótilos dos duplos mutantes fotomorfogenéticos-hormonais. Condições de medição iguais as das Figuras 2. Notar que, embora sejam experimentos independentes, os valores para os mutantes simples são bastante próximos ou estão na mesma ordem de magnitude daqueles apresentados na figura 2

3.2.2.5 Alongamento do hipocótilo dos mutantes fotomorfogenéticos na presença de hormônios exógenos

Os tratamentos utilizados para quantificar antocianinas foram os mesmos para avaliação do alongamento do hipocótilo. Foi medido o comprimento do hipocótilo após a permanência das plântulas em fotoperíodo de 16 horas durante 10 dias. Todos os hormônios exógenos, com exceção de GA, levaram a uma inibição do alongamento do hipocótilo no escuro e praticamente não afetaram o alongamento na luz (Figura 6). No caso de GA, esse estimulou o alongamento do hipocótilo na luz, sendo esse efeito menos pronunciado em *hp1* (Figura 6C). No escuro, GA somente estimulou o alongamento do hipocótilo em dose muito elevada (10^{-4} M). Essa constatação, corrobora sugestão prévia de que tecidos crescidos no escuro possuem alta concentração endógena de GA, o que limita o efeito de tratamentos exógenos (COWLING; HARBERD, 1999). Chama a atenção o fato da CK exógena ser capaz de inibir o alongamento na luz em MT, como já reportado por Mustilli et al. (1999) para outros cultivares, mas não efetivamente em *au* (Figura 6B). Esses resultados sugerem uma interação entre CK e phy no controle do alongamento do hipocótilo de tomateiro, o que

pode ser melhor verificado com o uso de duplos mutantes fotomorfogénicos-hormonais.

Figura 6 – Comprimento do hipocótilo de MT (controle) e dos mutantes fotomorfogênicos (*au* e *hp1*) medido em plântulas de 10 d crescidas na Luz e no escuro na presença de diferentes classes hormonais. As condições dos tratamentos com hormônios exógenos foram iguais aos da figura 3. Em cada tratamento, foram utilizados 20 hipocótilos (n = 20)

3.2.2.6 Alongamento do hipocótilo de mutantes fotomorfogénicos, hormonais e duplos mutantes

Conforme esperado, a deficiência do *phy* no mutante *au* promoveu um estiolamento mesmo na luz (Figura 7A). Porém, no escuro ocorreu pouca diferença entre esse mutante e MT (Figura 7B). Da mesma maneira, o mutante com alta sensibilidade à GA, *pro*, aumentou o alongamento na luz (Figura 7A), corroborando o efeito promotor desse hormônio exógeno observado nessa condição (Figura 6C). Entretanto, no escuro, o alongamento do hipocótilo de *pro* mostrou ser até inferior a MT (Figura 7B), o que reforça a hipótese de que no escuro GA já está em concentrações ótimas (COWLING; HARBERD, 1999; VANDENBUSSCHE et al., 2005; Capítulo 1). Outras mutações que também levaram a um maior alongamento dos hipocótilos na luz foram a de deficiência de ABA (*sit*) e as de pouca sensibilidade a AUX (*dgt*) e ET (*Nr*). Entretanto, no escuro nenhuma dessas mutações mostrou alongamento do hipocótilo superior a MT, sendo *dgt* inclusive bem inferior a MT. As mutações *epi* (excesso de ET) e *brt* (baixa sensibilidade à CK) mostraram hipocótilos pouco alongados tanto na luz quanto no escuro (Fig 7A-B).

Se considerada a diferença entre o comprimento do hipocótilo no escuro e na luz (Figura 7C), todas as mutações estudadas tiveram valores inferiores a MT. Tais valores são explicados em alguns genótipos mais pelo fato de promoverem o alongamento na luz (e.g. *au*, *Nr*, *pro* e *sit*) e em outros por principalmente inibirem o alongamento no escuro (*brt*, *epi* e *dgt*). Essa divisão em categorias (Figura 7D) confirma sugestões prévias para um efeito preferencial de AUX (*dgt*) no escuro (KRAEPIEL et al. 2001) e de GA (*pro*) na luz (COWLING; HARBERD, 1999). Além disso, o mutante em ABA (*sit*) parece ser similar ao mutante em GA (*pro*) no sentido de ser mais importante para o alongamento na luz, o que sugere que o efeito final pode ser um balanço entre essas duas substâncias, conforme demonstrado para germinação (WHITE et al. 2000) e aqui sugerido também para antocianinas (Figura 2, Figuras 3C e D). No caso do etileno, sua importância no alongamento mostrou ser tanto na luz quanto no escuro, evidenciado aqui pela promoção na luz devido a pouca sensibilidade (*Nr*) e a inibição no escuro devido ao excesso (*epi*).

Quanto aos duplos mutantes, a deficiência de *phy* (*au*), a qual promove o alongamento na luz, mostrou ser sinérgica (Figura 8) ao efeito de *pro*, *sit*, *dgt* e *Nr* na promoção do alongamento do hipocótilo nessa mesma condição (Figura 7A). No escuro, uma condição onde *au* tem uma certa promoção no alongamento, mas os mesmos mutantes hormonais não mostraram ser superiores a MT (Figura 7B), o efeito observado nos duplos com *au* foi aditivo (valores intermediários) (Figura 8). Efeitos aditivos também foram observados na combinação da mutação de alta produção de ET (*epi*) com *au* tanto no claro quanto no escuro. Efeitos aditivos e sinérgicos são similares no sentido de sugerirem vias independentes de transdução de sinal entre os hormônios GA, ABA, AUX e ET e o fitocromo no controle do alongamento do hipocótilo tanto na luz quanto no escuro. No caso do duplo mutante *au brt*, chama a atenção o fato da inibição provocada por *brt* ser epistática à promoção provocada por *au* na luz (Figura 7A). O fato de no escuro as diferenças entre *au* e MT serem menores parece fazer com que o efeito epistático de *brt* seja menos visível, contudo, ainda assim, no duplo mutante *au brt*, o alongamento do hipocótilo é bem próximo àquele observado no mutante *brt*. Esses resultados, somado ao pouco efeito da CK exógena em *au* na luz (Figura 6B), sugerem que, ao contrário das demais classes hormonais testadas, a CK pode partilhar com o *phy* uma mesma via de transdução de sinal para o alongamento do hipocótilo, conforme também sugerido aqui para o acúmulo de antocianinas (Figuras 3B e 5).

Figura 7 - Comprimento do hipocótilo em mutantes e duplos mutantes fotomorfogênicos-hormonais crescidos na luz (**A**) e no escuro (**B**), bem como a variação (Δ) no comprimento do hipocótilo entre as duas condições (**C**). Notar que todos os genótipos apresentaram Δ menor que MT, o que pode ser explicado pela promoção do alongamento na luz ou pela inibição desse no escuro, dependendo de cada mutação ou combinação de mutações (**D**). Condições de medição iguais as da figura 7

Figura 8 – Resumo das interações hormônio-fitocromo no alongamento do hipocótilo e acúmulo de antocianinas em plântulas de tomateiro crescidas sob luz. As interações foram observadas em duplos mutantes combinando a deficiência do cromóforo do fitocromo (*au*) e diferentes mutantes hormonais (**Tabela 1**). Interações aditivas (**A**) e sinérgicas (**B**) indicam vias independentes (paralelas) de transdução de sinal ou metabólicas, já que o duplo mutante apresenta uma combinação dos efeitos (fenótipo intermediário) de cada mutante simples. Se os dois mutantes simples utilizados possuem efeitos similares (ex.: *m1* e *m3* em **B**), o fenótipo do duplo mutante será sinérgico, acentuando o aspecto superior (ou inferior) ao tipo não mutado (MT). Se os mutantes simples possuem efeitos opostos (ex.: *m1* e *m2* em **A**) ou em características não relacionadas, o fenótipo do duplo mutante será simplesmente aditivo, levando a uma média ou observação simultânea dos dois efeitos. Interações epistáticas (**C**) indicam a mesma via metabólica ou de transdução de sinal. Nesse caso, o fenótipo do duplo mutante irá ser igual ao de um dos mutantes simples. No exemplo proposto, o mutante *m4* é epistático a *m1* quanto ao seu efeito na inibição do alongamento do hipocótilo e sofre epistasia de *m1*, o qual diminui o acúmulo de antocianinas no hipocótilo. Notar que a interação entre deficiência de fitocromo (*phy⁻*) e pouca sensibilidade a citocinina (*CK⁻*) mostrou ser interdependente (epistática) tanto para o alongamento do hipocótilo quanto para acúmulo de antocianinas. No entanto, enquanto para alongamento, *CK⁻* é epistática a *phy⁻*, para o acúmulo de antocianinas ocorre o contrário. A interação aditiva ou sinérgica nos mutantes entre as demais classes hormonais e *phy⁻* sugere vias paralelas de sinalização tanto para alongamento quanto para acúmulo de antocianinas no hipocótilo. Todas as interações aqui resumidas foram deduzidas a partir dos resultados apresentados nas figuras 5 e 7

3.2.3 Discussão

3.2.3.1 CK e ABA promovem e GA inibe o acúmulo de antocianinas em hipocótilos de tomateiro

A importância das CKs para o acúmulo de antocianinas em hipocótilos de tomateiro foi anteriormente sugerida por Coenen e Lomax (1998) e Mustilli et al. (1999). Além disso, Pino-Nunes (2005) mostrou que o mutante pouco sensível a CK, *brt*, não responde às concentrações crescentes de CK para a biossíntese de antocianinas como ocorre no controle MT. No presente estudo, aplicação exógena de CK também levou a um acúmulo de antocianinas em MT, e em menor extensão no mutante deficiente em fitocromo (Figura 3B). Contudo, o nível basal de antocianinas em *brt* não provou ser inferior ao controle MT (Figura 2). Esses resultados sugerem que CK é mais limitante para um acúmulo extra de antocianinas em resposta a alta luminosidade, e talvez outros fatores ambientais. Duplos mutantes com excesso de resposta a luz e pouca sensibilidade a CK, *hp1 brt*, bem como plantas transgênicas superprodutoras de CK, estão sendo produzidos no momento e facilitarão o teste de tal hipótese. Na ausência de plantas com excesso de CKs, o mutante *dgt*, o qual apresentou um acúmulo proeminente de antocianinas (Figura 2), pode ser o resultado de uma resposta ao balanço AUX/CK mais voltado para CKs, conforme sugerido por Coenen et al., (2003). Uma hipótese alternativa seria de que o excesso de antocianinas nos hipocótilos de *dgt* seria uma resposta direta à baixa sensibilidade a AUX. Tal hipótese implicaria em que AUX seria um inibidor do acúmulo de antocianinas, o que não encontra respaldo nos resultados de aplicação exógena desse hormônio (Figura 3A).

Um outro promotor do acúmulo de antocianinas em hipocótilo de tomateiro seria o ABA, o que é suportado tanto pelo fenótipo dos mutantes deficientes *not* (Figura 2) e *sit* (Figura 5), quanto pela aplicação exógena (Figura 3C). A associação entre ABA e antocianinas, bem como outros flavonóides, já havia sido reportado antes para diferentes espécies vegetais (WALTON; SONDHEIMER, 1968; PIRIE; MULLINS, 1976; HUIJSER et al., 2000; NAGIRA et al., 2006). Além disso, há relatos de que mutantes de tomateiro hipersensíveis a ABA acumulem mais antocianinas nos hipocótilos (FELLNER et al., 2001, SHEORAN et al., 2006).

Enquanto CKs e ABA provaram ter um papel na promoção do acúmulo de antocianinas nos hipocótilos de tomateiro, a GA parece ser o principal inibidor. Nossos resultados suportam essa hipótese não só devido ao grande efeito que a aplicação exógena possui na inibição desse flavonóide (Figura 3D), mas também pelo fato do mutante hipersensível à GA, *pro*, possuir níveis muito reduzidos (Figuras 2 e 5). Apesar de ser bem conhecido o efeito de GA no alongamento do hipocótilo (COWLING; HARBERD, 1999), poucos trabalhos têm explorado a atividade da GA na produção de antocianinas nesse órgão. Em tomateiro, o efeito da GA na redução das antocianinas em hipocótilos foi inicialmente proposto por Perez et al., (1974). Em outras espécies, a aplicação de GA tem sido mostrada aumentar (WEISS; HALEVY, 1989; WEISS et al., 1992; WEISS et al., 1995) ou reduzir (FURUYA; THIMAMM, 1964; VINCE, 1968; GURUPRASAD; LALORAYA, 1980; OZEKI; KOMAMINE, 1986; MIZUKAMI et al., 1988) o nível de antocianinas, indicando que as respostas à GA para a biossíntese desses pigmentos dependem da espécie, bem como do órgão e estágio desenvolvimental. O decréscimo dos níveis de antocianinas já havia sido reportado também para folhas jovens do mutante *pro* (VAN TUINEN et al., 1999), o que indica que o efeito de GA não se restringe ao hipocótilo de tomateiro.

Como CK, ABA e GA também afetam o alongamento do hipocótilo, seria razoável supor que o efeito no acúmulo de antocianinas poderia ser indireto, concentrando esse pigmento pela inibição do alongamento (efeito de CK e ABA) ou diluindo-o pelo crescimento do hipocótilo (efeito de GA). Em nossas medições, os valores de antocianinas estão expressos por hipocótilo inteiro e não por massa, o que minimiza um possível efeito de diluição ou concentração por diferenças no alongamento. Além disso, enquanto aplicação de CKs e ABA promoveram o acúmulo de antocianinas nos hipocótilos de MT (Figuras 3B e C) cultivados na luz, essas classes hormonais não tiveram um efeito de igual magnitude na inibição do alongamento do hipocótilo na luz (Figuras 6B e D). Do mesmo modo, a promoção do alongamento do hipocótilo na luz devido à aplicação de GA (Figura 6C) é bastante inferior ao proeminente efeito que essa classe hormonal teve na inibição do acúmulo de antocianinas (Figura 3D).

3.2.3.2 Controle hormonal do alongamento do hipocótilo de tomateiro na luz e escuro

A função da AUX em controlar o alongamento do hipocótilo pode variar entre as condições de luz e escuro, bem como entre as espécies (VOLMARO et al., 1998; JENSEN; HANGARTER; ESTELLE, 1998; PARK, 1998; COLLET; HARBERD; LEYSER, 2000; KRAEPIEL et al., 2001; GOLOVATSKAYA; KARNACHUK 2007). Sob nossas condições, a baixa sensibilidade a AUX do mutante *dgt* mostrou ser bastante limitante para o alongamento do hipocótilo no escuro, o que já havia sido demonstrado antes (KELLY; BRADFORD 1986; KRAEPIEL et al. 2001). Sendo assim, poderia se esperar que auxina exógena aumentaria o alongamento no escuro, o que não ocorreu (Figura 6A). Um inconveniente para a interpretação de resultados de aplicações exógenas é o efeito que certas classes hormonais possuem sobre o nível endógeno de outras (PERES et al., 1999). Desse modo, sugere-se que a forte inibição que a aplicação de ANA no escuro provocou no comprimento dos hipocótilos seja o conhecido efeito de auxina sobre o ET endógeno (YOSHII; IMASEKI, 1981; HANSEN; GROSSMANN, 2000; OHMIYA; HAJI, 2002). De fato, além do ET exógeno ser bastante inibitório para o alongamento do hipocótilo de tomateiro no escuro (Figura 6E), o mutante superprodutor desse hormônio foi o que mais inibiu nessa condição (Figura 7B).

Um papel para o ET na inibição dos hipocótilos no escuro já havia sido reportado para *Arabidopsis* (CARY; LIU; HOWELL, 1995; COLLET; HARBERD; LEYSER, 2000). Porém, nessa espécie vegetal foi mostrado que, na luz, o ET pode também agir como promotor do alongamento, já que o mutante com respostas constitutivas ao ET, *ctr1*, apresentou um acréscimo no alongamento na luz comparado ao controle (SMALLE et al. 1997). Um efeito promotor do ET no alongamento do hipocótilo de tomateiro na luz é pouco provável, considerando-se que o mutante *epi* mostrou ter hipocótilos inibidos na luz (Figura 7A). Além disso, enquanto o mutante de tomateiro pouco sensível a ET, *Nr*, apresentou hipocótilos maiores que MT (Figura 7A), a mutação *ein2-1*, a qual resulta em baixa sensibilidade a ET em *Arabidopsis*, possui efeito oposto (SMETS et al. 2005). Esses resultados sugerem que, assim como outras respostas desenvolvimentais controladas por ET, tais como o amadurecimento de frutos (GIOVANNONI, 2001), o

papel desse hormônio no alongamento do hipocótilo na luz é bastante diferente entre *Arabidopsis* e tomateiro.

A resposta mais óbvia da atividade exógena da CK em plântulas de tomateiro é a inibição do alongamento do hipocótilo (MUSTILLI, et al. 1999; COENEN et al. 2003). Esse evento pôde ser bem observado em plântulas de *au* e MT cultivados em concentrações crescentes de CK no escuro (Figura 6B). Resultados semelhantes foram encontrados em plântulas de *Arabidopsis*, as quais mostram uma inibição proporcional ao aumento da concentração de CK no escuro (SU; HOWELL, 1995). Considerando a CK como um inibidor, poderia ser esperado que o mutante de tomateiro pouco sensível a CK, *brt*, não apresentasse hipocótilos tão inibidos no escuro (Figura 7B). De igual modo, embora na luz as CKs tenham mostrado um efeito inibitório em MT (Figura 6B) e em *Arabidopsis* (SU; HOWELL, 1995), o mutante *brt* também apresentou-se inibido nessa condição (Figura 7A), quando seria esperado o contrário. Além disso, o mutante *amp1* de *Arabidopsis* (CHAUDHURY, et al., 1993), o qual apresenta níveis elevados de CK, possui hipocótilos também inibidos (CARY; LIU; HOWELL, 1995). Em conjunto, esses resultados sugerem que as CKs *per se* devem ter um papel estimulatório no alongamento do hipocótilo de tomateiro e *Arabidopsis*, sendo inibitório seu efeito exógeno (Figura 6B, SU; HOWELL, 1995) ou endógeno (CARY; LIU; HOWELL, 1995) mediado pelo ET, como já demonstrado para *Arabidopsis* (CARY; LIU; HOWELL, 1995). Como exemplo disso, Smets et al. (2005) demonstraram que CKs podem promover o alongamento em plântulas de *Arabidopsis* presentes na luz utilizando um inibidor da ação do ET.

O maior alongamento na luz do mutante deficiente na biossíntese de ABA, *sit* (Figura 7A), corrobora o efeito exógeno desse hormônio (Figura 6D), sugerindo ABA como inibidor do alongamento nessa condição. Por outro lado, no escuro, a forte inibição do ABA exógeno em *au* e MT (Figura 6D) não é respaldado para um maior crescimento do mutante *sit* nessa condição (Figura 7B). Esses resultados sugerem que, embora hipocótilos de tomateiro crescidos no escuro possam ser inibidos por ABA exógeno, ou por outras classes hormonais induzidas por ele (GHASSEMIAN et al., 2000; HANSEN; GROSSMANN, 2000), o ABA endógeno provavelmente não se

acumula nessa condição, como sugere o padrão de expressão de genes envolvidos com a biossíntese de ABA em tomateiro (THOMPSON et al., 2000).

O controle do alongamento do hipocótilo por GA é o evento mais bem caracterizado envolvendo um fator endógeno e o desenvolvimento da plântula (KRAEPIEL; MIGINIAC, 1997; COWLING; HARBERD 1999). Atualmente sabe-se que o efeito de GA na promoção do crescimento é na verdade através da repressão de proteínas inibidoras com domínio DELLA (PENG et al., 1997; Dill; Sun, 2001; KING; MORITZ; HARBERD, 2001). Entre os vários efeitos de proteínas DELLA, recentemente se constatou que são reguladoras de fatores de transcrição para fotomorfogênese (ACHARD et al., 2007). A promoção do alongamento do hipocótilo de tomateiro na luz, devido a GA exógena (Figura 6C) já foi relatada para tomateiro (PEREZ et al. 1974) e outras espécies (SRIVASTAVA; SAWHNEY; TAYLOR, 1975; TAYLOR; COSGROVE; 1989; COWLING; HARBERD, 1999). Porém, o efeito da GA no escuro parecer ser menos evidente, somente havendo promoção em concentrações muito elevadas (10^{-4} M) (Figura 6C). Esse resultado parece estar de acordo com a proposta de que no escuro GA já esteja em níveis ótimos (COWLING; HARBERD, 1999). Uma evidência adicional de que o GA seja mais importante para o alongamento do hipocótilo na luz que no escuro é o fato do mutante supersensível à GA, *pro*, possuir na luz um comprimento do hipocótilo 43% maior que MT, enquanto no escuro ele apresenta-se menor (Figura 7B).

3.2.3.3 AUX, ET, GA e ABA possuem vias distintas de phy no controle do acúmulo de antocianinas e alongamento do hipocótilo de tomateiro enquanto phy e CK podem partilhar uma mesma via nessas respostas

Levando-se em conta a necessidade de fotoproteção e ao mesmo tempo de evitação à sombra, a luz é o fator mais evidente no estímulo da produção de antocianinas (FRANCESCHI; GRIMES, 1991; KROL et al., 1995; ATANASSOVA et al., 2001; STEYN et al., 2002) e na inibição do alongamento do hipocótilo (SYMONS; REID, 2003; VANDENBUSSCHE et al. 2005). Entretanto, a luz e sua percepção por fotorreceptores é apenas um sinal, o qual precisa ser transduzido por outros mensageiros químicos (NEFF et al. 2006). Tais mensageiros têm como fortes candidatos os hormônios, pois esses fatores endógenos claramente podem controlar a

biossíntese de antocianinas e o alongamento do hipocótilo. No presente trabalho, a produção de antocianinas foi promovida por CK e ABA e inibida por GA (Figuras 2, 3, 4 e 5), enquanto o alongamento do hipocótilo foi inibido na luz por ET, AUX, ABA e promovido por CK e GA (Figuras 6 e 7). A análise de duplos mutantes entre mutantes em AUX, GA, ET e ABA e a mutação que provoca deficiência de fitocromo mostrou fenótipos aditivos ou sinérgicos quanto ao alongamento do hipocótilo e acúmulo de antocianinas (Figura 8). Interações aditivas e sinérgicas (Figura 8) significam rotas metabólicas distintas ou vias independentes de transdução, descartando a hipótese de que o fitocromo afeta o alongamento e o acúmulo de antocianinas no hipocótilo de tomateiro modulando essas classes hormonais. Tomando como exemplo da interação entre fitocromo e GA, já foi sugerido que o aspecto estiolado de mutantes deficientes em fitocromo pode refletir um excesso de GA ou de resposta a esse hormônio (PEREZ et al. 1974). Considerando a importância de GA e phy na germinação de sementes (TOYOMASU et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 1998; YAMAGUCHI; KAMIYA, 2002; SEO et al., 2006), a baixa taxa de germinação do mutante *au* e o aumento no mutante *pro* (KOORNNEEF et al., 1985; Capítulo 1) reforçam nossa hipótese de que, pelo menos em tomateiro, GA e fitocromo agem em vias independentes.

Apesar de ter sido sugerida a modulação negativa de ABA pelo fitocromo (KRAEPIEL et al., 1994; WEATHERWAX et al., 1996; SYMONS; REID, 2003, SEO et al., 2006), nossos resultados mostram interação sinérgica no alongamento do hipocótilo e aditiva no acúmulo de antocianinas para o duplo *au sit* (Figura 8), o que sugere que, pelo menos para essas duas respostas, fitocromo e ABA agem em vias paralelas em tomateiro.

Os trabalhos que tratam da interação entre luz e ET no controle do desenvolvimento em grande parte abordam o phy como inibidor desse hormônio (GOESCHL; PRATT; BONNER, 1967; FINLAYSON; LEE; MORGAN, 1998, FINLAYSON et al., 1999; PIERIK et al., 2003; KUREPIN; WALTON; REID, 2007). Entretanto, em tomateiro, a interação entre luz e ET mostrou ser sempre aditiva, independente do tipo de mutação em ET (*epi* ou *Nr*), tanto para alongamento do hipocótilo quanto para acúmulo de antocianinas (Figura 8). Se a falha na capacidade de reduzir o nível endógeno ET fosse a causa do fenótipo do mutante deficiente em phy, seria de se

esperar um efeito epistático da pouca sensibilidade a ET (*Nr*) sobre a deficiência de phy (*au*) no duplo mutante.

De modo diferente do que ocorreu com outras classes hormonais, o duplo mutante entre CK e phy, *au brt*, apresentou uma interação epistática tanto no acúmulo de antocianinas quanto no alongamento do hipocótilo (Figura 8). No acúmulo dos pigmentos, a redução em *au brt* a um nível próximo a *au* mostra uma epistasia de *au* sobre *brt* (Figura 5), e de modo contrário, no alongamento do hipocótilo a redução de *au brt* a um nível próximo de *brt* mostra uma epistasia de *brt* sobre *au* (Figura 7). Essas relações sugerem fortemente que phy e CK podem partilhar uma via comum no controle da biossíntese de antocianinas e alongamento do hipocótilo, bem como em outras respostas, pois plantas adultas de *au brt* são bastante debilitadas (Figura 1F). Su e Howell (1995) consideraram que CK e phy possuem um efeito independente no controle do alongamento do hipocótilo de *Arabidopsis*. Contudo, esses autores se basearam no efeito exógeno de CKs em hipocótilos mantidos no escuro, o qual somente mostrou o efeito inibitório dessa classe hormonal, sendo o mesmo mediado por ET (CARY; LIU; HOWELL, 1995). Embora CK exógena também tenha um efeito inibitório em hipocótilos de tomateiro cultivados no escuro (Figura 6B), o baixo alongamento do hipocótilo do mutante pouco sensível a CK, *brt*, tanto no escuro quanto na luz (Figuras 7A e B), sugere que o efeito endógeno e direto desse hormônio seja na verdade estimulatório. De fato, Smets et al. (2005) demonstraram que mesmo a CK exógena pode estimular o alongamento do hipocótilo de *Arabidopsis* no escuro se a ação do ET é bloqueada. Desse modo, a epistasia de *brt* sobre *au* no alongamento do hipocótilo do duplo *au brt* na luz (Figura 7A) sugere que a promoção do alongamento do hipocótilo pela deficiência de phy é uma resposta dependente da sensibilidade a CKs ou de componentes comuns às duas vias de sinalização. Suportando tal hipótese está o fato de se saber que o receptor de CK pode ser uma histidina quinase (YEH; LAGARIAS, 1998), sendo essa classe de proteínas relacionadas um dos domínios presentes na apoproteína do fitocromo (KIM et al., 2005). Além disso, pelo menos um dos reguladores de resposta (ARR4) que fazem parte da via de dois componentes da sinalização das CKs também fazem parte da transdução de sinal de phy do tipo B (SWEERE et al. 2001).

No presente estudo, ficou claro que entre as cinco principais classes hormonais, a que possui maior probabilidade de interagir diretamente com a fotomorfogênese é a CK, o que resgata a proposta original de Chory et al. (1991) e que havia sido posteriormente refutada (SU; HOWELL, 1995). Duplos mutantes combinando resposta exageradas à luz e baixa sensibilidade à CK, *hp1 brt*, bem como outras combinações com plantas transgênicas superprodutoras ou deficientes nesse hormônio (EKLÖF et al., 2000; WERNER et al., 2001; WERNER et al., 2003) estão sendo construído para um aprofundamento do estudo dessa possível interação entre phy e CKs no controle do alongamento do hipocótilo e acúmulo de antocianinas.

3.3 Conclusão

Conclui-se com os resultados obtidos nesse trabalho que os hormônios AUX, ET, GA e ABA possuem vias distintas do phy no controle do acúmulo de antocianinas e alongamento do hipocótilo, e com a Ck esse fotorreceptor pode partilhar uma mesma via.

Referências

- ACHARD, P.; LIAO, L.; JIANG, C.; DESNOS, T.; BARTLETT, J.; FU, X.; HARBERD, N. P. DELLAs Contribute to Plant Photomorphogenesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 3, p. 1163 – 1172, 2007.
- ALOKAM, S.; CHINNAPPA, C.C.; REID, D.M. Red/far-red mediated stem elongation response and anthocyanin accumulation in alpine and prairie ecotypes of *Stellaria longipes*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, p. 72-81, 2002.
- ATANASSOVA, B.; DASKALOV, S.; SHTEREVA, L.; BALATCHEVA, E. Anthocyanin mutations improving tomato and pepper tolerance to adverse climatic conditions. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 357-365, 2001.
- BENSEN, R.J.; ZEEVAART, J.A.D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib1*, *gib2* and *gib3* tomato plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, p. 237-242, 1990.
- BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p. 1761–1766, 1999.

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

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.S. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 1075–1082, 1995.

CHALKER-SCOTT, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 70, p. 1–9, 1999.

CHAUDHURY, A.M.; LETHAM, S.; CRAIG, S.; DENNIS, E.S. *amp 1* - A mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. **Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 907-916, 1993.

CHORY, J.; AGUILAR, N.; PETO, C.A. The phenotype of *Arabidopsis thaliana det1* mutants suggests a role for cytokinins in greening. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 45, p. 21–29, 1991.

CHORY, J.; REINECKE, D.; SIM, S.; WASHBURN, T.; BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis det* mutants have an altered response to cytokinins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 339–347, 1994.

COENEN, C.; CHRISTIAN, M.; LÜTHEN, H.; LOMAX, T.L. Cytokinin antagonizes auxin action through inhibiting a subset of DGT-dependent, primary auxin responses in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 1692-1704, 2003.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 2, p. 351-356, 1997.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 63-72, 1998.

COLLET, C.E.; HARBERD, N.P.; LEYSER, O. Hormonal interactions in the control of *Arabidopsis* hypocotyl elongation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 553-562, 2000.

COWLING, R.J.; HARBERD, N.P. Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p. 1351-1357, 1999.

DEIKMAN, J.; HAMMER P. E. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 47-57, 1995.

DILL, A.; SUN, T-P. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, Bethesda, v. 159, p. 777–785, 2001.

DORTAY, H.; MEHNERT, N.; BURKLE, L.; SCHMULLING, T.; HEYL, A. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. **Federation of European Biochemical Societies journal**, Oxford, v. 273, p. 4631-4644, 2006.

ECKARDT, N.A. A new classic of cytokinin Research: Cytokinin-deficient *Arabidopsis* plants provide new insights into cytokinin biology. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2489-2492, 2003.

EKLÖF, S.; ÅSTOT, C.; SITBON, F.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overexpressing phenotypes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 279–284, 2000.

FELLNER, M.; ZHANG, R.; PHARIS, R. P.; SAWHNEY, V. K. Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 725-738, 2001.

FINLAYSON, S.A.; JUNG, I.J.; MULLET, J.E.; MORGAN, P.W. The mechanism of rhythmic ethylene production in sorghum: the role of phytochrome B and simulated shading. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1083–1089, 1999.

FINLAYSON S.A.; LEE, I.J.; MORGAN, P.W. Phytochrome B and the regulation of circadian ethylene production in sorghum. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 17–25, 1998.

FRANCESCHI, V.R.; GRIMES, H.D. Induction of soybean vegetative storage proteins and anthocyanins by low-level atmospheric methyl jasmonate. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 88, p. 6745–6749, 1991.

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

FURUYA, M.; THIMANN, K.V. The biogenesis of anthocyanins. XI. Effects of gibberellic acid in two species of Spirodela. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 108, p. 109–1016, 1964.

GHASSEMIAN, M.; NAMBARA, E.; CUTLER, S.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; MCCOURT, P. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 1117–1126, 2000.

GIOVANNONI, J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 725–749, 2001.

GOESCHL, J.D.; PRATT, H.K.; BONNER, B.A. An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 42, n. 8, p.1077–1080, 1967.

GOLOVATSKAYA, I.; KARNACHUK, R. Dynamics of growth and the content of endogenous phytohormones during kidney bean scoto- and photomorphogenesis. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 54, n. 3, p. 407–413, 2007.

GURUPRASAD, K.N. ; LALORAYA, M.M. Dissimilarity in the inhibition of betacyanin synthesis caused by gibberellic-acid and abscisic-acid. **Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen**, Berlin, v. 175, p. 582–586, 1980.

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

HICKS, G.R.; RAYLE, D.L.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, Washington, v. 254, p. 52–54, 1989.

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

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

HUIJSER, C.; KORTSTEE A.; PEGO, J.; WEISBEEK, P.; WISMAN, E.; SMEEKENS, S. The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 577–585, 2000.

HUSAINID, S.S.H.; KOK, R.A.; SCHREUDER, M.E.L.; HANUMAPPA, M.; CORDONNIER-PRATT, M.; PRATT, L.H.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN DER KROL, A.R. Overexpression of homologous phytochrome genes in tomato: exploring the limits in photoperception. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 615–626, 2007.

JENSEN, P.J.; HANGARTER, R.P.; ESTELLE, M. Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 455–462, 1998.

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

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

KENDRICK, R.E.; KRONENBERG, G.H.M. (Ed). **Photomorphogenesis in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 828, 1994.

KENDRICK, R.E.; KERCKHOFFS, L.H.; VAN TUINEN, A.; KOORNNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Plant, Cell Environment**, Oxford, v. 20, p. 746-751, 1997.

KERCKHOFFS, L.H.J.; SCHREUDER, M.E.L.; VAN TUINEN, A.; KOORNNEEF, M.; KENDRICK, R.E. Phytochrome control of anthocyanin biosynthesis in tomato seedlings: analysis using photomorphogenic mutants. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 65, p. 374–381, 1997.

KIM, J-I.; PARK, J-E.; ZARATE, X.; SONG, P-S. Phytochrome phosphorylation in plant light signaling. **Photochemical & Photobiological Sciences**, New York, v. 4. p. 681-687, 2005.

KING, K.; MORITZ, T.; HARBERD, N.P. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. **Genetics**, Bethesda, v. 159, p. 767–776, 2001.

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

KOORNNEEF, M.; CONE, J.W.; DEKENS, R.G.; O'HERNE-ROBERS, E.G.; SPRUIT, C.J.P.; KENDRICK, R.E. Photomorphogenetic response of long-hypocotyl mutants of tomato. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 120, p. 153-165. 1985.

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

KOORNNEEF, M. Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. **Arabidopsis Information Service**, New York, v. 27, p. 1-4, 1990.

KRAEPIEL, Y.; AGNES, C.; THIERY, L.; MALDINEY, R.; MIGINIAC, E.; DELARUE, M. The growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) hypocotyls in the light and in darkness differentially involves auxin. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 1067-1074, 2001.

KRAEPIEL, Y.; ROUSSELIN, P.; SOTTA, B.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; CABOCHE, M.; MIGINIAC, E. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 665–672, 1994.

KROL, M.; GRAY, G.R.; HURRY, V.M.; ÖQUIST, L.; MALEK, L.; HUNER, N.P.A. Low temperature stress and photoperiod effect. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1119–1127, 1995.

KRAEPIEL, Y.; MIGINIAC, E. Photomorphogenesis and phytohormones. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, p. 807–812, 1997.

KUREPIN, L.V.; WALTON, L.J.; REID, D.M. Interaction of red to far red light ratio and ethylene in regulating stem elongation of *Helianthus annuus*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 51, p. 53–61, 2007.

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

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

MIZUKAMI, H.; TOMITA, K.; OHASHI, H.; HIRAOKA, N. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, p. 553–556, 1988.

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

MUSTILLI, A.C.; FENZI, F.; CILIENTO, R.; ALFANO, F.; AND BOWLER, C. Phenotype of the tomato *high pigment-2* mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *DEETIOLATED1*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 145–157, 1999.

NAGIRA, Y.; IKEGAMI, K.; KOSHIBA, T.; OZEKI, Y. Effect of ABA upon anthocyanin synthesis in regenerated torenia shoots. **Journal of Plant Research**, Sendai, v. 119, n. 2, p. 137–144, 2006.

NEFF, M.M.; CHORY, J. Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 27–36, 1998.

NEFF, M.M.; STREET, I.H.; TURK, E.M.; WARD, J.M. Interaction of light and hormone signalling to mediate Photomorphogenesis. In: SCHAFER, E.; NAGY, F. (Ed),

Photomorphogenesis in Plants and Bacteria. Netherlands: Springer, 2006. chap. 21, p. 439-473.

OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling. **Planta**, Berlin, v. 224, n. 1, p. 133-144, 2006.

OHMIYA, A.; HAJI, T. Promotion of ethylene biosynthesis in peach mesocarp discs by auxin. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 36, p. 209–214, 2002.

OZEKI, Y.; KOMAMINE, A. Effects of growth regulators on the induction of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 27, n. 7, p. 1361-1368; 1986.

PARK, W.J. Effect of epibrassinolide on hypocotyl growth of the tomato mutant *diageotropica*. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 120–124, 1998.

PENG, J.; CAROL, P.; RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; COWLING, R.J.; MURPHY, G.P.; HARBERD, N.P. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes and Development**, New York, v. 11, p. 3194–3205, 1997.

PERES, L. E. P.; AMAR, S.; KERBAUY, G. B; SALATINO, A.; ZAFFARI, G. R. & MERCIER, H. Effects of auxin, cytokinin and ethylene treatments on the endogenous ethylene and auxin-to-cytokinin ratio related to direct root tip conversion of *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) into buds. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, p. 551-555, 1999.

PEREZ, ANTONIO T.; MARSH, HERBERT V., JR.; LACHMAN, WILLIAM H. Physiology of the *Yellow-green 6* gene in tomato: A possible interrelationship between the phenotypic expressions of the *yellow-green 6* gene mutation and the gibberellins 12. **Plant Physiology**, Rockville, v. 53, n. 2, p. 192–197, 1974.

PETERS, J.L.; VAN TUINEN, A.; ADAMSE, P.; KENDRICK, R.E.; KOORNNEEF, M. High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 134, p. 661-666, 1989.

PIERIK, R.; VISSER, E.J.W.; DE KROON, H.; VOESENEK, L.A.C.J. Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 1229–1234, 2003.

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

PIRIE, A.; MULLINS, M. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 58, p. 468–472, 1976.

SCOTT, J.W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experiment Station Circular**, Gainesville, v. 370, p. 1-6, 1989.

SEO, M.; HANADA, A.; KUWAHARA, A.; ENDO, A.; OKAMOTO, M.; YAMAUCHI, Y.; NORTH, H.; MARION-POLL, A.; SUN, T.P.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; YAMAGUCHI, S.; NAMBARA, E. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: Phytochrome-regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid-regulation of gibberellin metabolism. The **Plant Journal**, Oxford, v. 48, p. 354-366, 2006.

SHEORAN, I.S.; DUMONCEAUX, T.; DATLA, R.; SAWHNEY, VK. Anthocyanin accumulation in the hypocotyl of an ABA-over producing male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum*) mutant. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 127, n. 4, p. 681-689, 2006.

SMALLE, J.; HAEGMAN, M.; KUREPA, J.; VANMONTAGU, M.; VANDERSTRAETEN, D. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, p. 2756–2761, 1997.

SMETS, R.; LE, J.; PRINSEN, E.; VERBELEN, J.; VAN ONCKELEN, H. Cytokinin-induced hypocotyl elongation in light-grown *Arabidopsis* plants with inhibited ethylene action or indole-3-acetic acid transport. **Planta**, Berlin, v. 221, p. 39–47, 2005.

SRIVASTAVA, L.M.; SAWHNEY, V.K.; TAYLOR, I.E.P. Gibberellic-acid-induced cell elongation in lettuce hypocotyls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1107-1111, 1975.

STEYN, W.J.; WAND, S.J.E.; HOLCROFT, D.M.; JACOBS, G. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. **New Phytologist**, London, v. 155, p. 349–361, 2002.

SU, W.; HOWELL, S.H. The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1423-1430, 1995.

SYMONS, G.M.; REID, J.B. Interactions between light and plant hormones during de-etiolation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 3–14, 2003.

SWEERE, U.; EICHENBERG, K.; LOHRMANN, J.; MIRA-RODADO, V.; BAURLE, I.; KUDLA, J.; NAGY, F.; SCHAFER, E.; HARTER, K. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. **Science**, Washington, v. 294, p. 1108-11, 2001.

TAYLOR, A.; COSGROVE, D.J. Gibberellic acid stimulation of cucumber hypocotyl elongation: effects on growth, turgor, osmotic pressure, and cell wall properties. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 1335–1340, 1989.

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

THOMPSON, A.J.; JACKSON, A.C.; SYMONDS, R.C.; MULHOLLAND, B.J.; DADSWELL, A.R.; BLAKE, P.S.; BURBIDGE, A.; TAYLOR, I.B. Ectopic expression of a tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 363–374, 2000.

TOYOMASU, T.; KAWAIDE, H.; MITSUHASHI, W.; INOUE, Y.; KAMIYA, Y. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, 1517 – 1523, 1998.

VAN TUINEN, A.; PETERS-AHL, J.; KENDRICK, R.E.; ZEEVAART, J.A.D. KOORNNEEF, M. Characterisation of the *procera* mutant of tomato and the interaction of gibberellins with end-of-day far-red light treatments. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 106, n. 1, p. 121-128, 1999.

VANDENBUSSCHE, F.; HABRICOT, Y.; CONDIFF, A.S.; MALDINEY, R.; STRAETEN, D.V.; AHMAD, M. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 3, p. 428-41, 2007.

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

VINCE; D. Growth and anthocyanin synthesis in excised Sorghum internodes. I. Effects growth regulating substances. **Planta**, Berlin, v. 82, p. 261-279, 1968.

VON ARNIM, A.; DENG, X.W. Light control of seedling development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p.215-243, 1996.

VOLMARO, C.; PONTON, M.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Blue light effects on hypocotyl elongation of etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L) cv Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA3 and abscisic acid. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 26, p. 165-173, 1998.

WALTON, D.C.; SONDHEIMER, E. Effects of abscisic acid on phenylalanine ammonia-lyase activity in excised bean axes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, p. 467–469, 1968.

WEATHERWAX, S.C.; ONG, M.; DEGENHARDT, J.; BRAY, E.; TOBIN, E.M. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 363-370, 1996.

WEISS, D.; HALEVY, A.H. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*. **Planta**, Berlin, v. 179, p. 89–96, 1989.

WEISS, D.; VAN BLOKLAND, R.; KOOTER, J.M.; MOL, J.N.M.; VAN TUNEN, A. Gibberellic acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of *Petunia hybrida*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, p. 191-197, 1992.

WEISS, D.; VAN DER LUIT, A.; KNEGT, E.; VERMEER, E.; MOL, J. N. M.; KOOTER, J. M. Identification of endogenous gibberellins in petunia flowers. Induction of anthocyanin biosynthetic gene expression and the antagonistic effect of abscisic acid **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 695-702, 1995.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 10487–10492, 2001.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; LAUCOU, V.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in regulating shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2532-2550, 2003.

WHITE, C.N.; PROEBSTING, W.M.; HEDDEN, P.; RIVIN, C.J. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1081–1088, 2000.

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

YAMAGUCHI, S.; SMITH, M.W.; BROWN, R.G.S.; KAMIYA, Y.; SUN, T.P. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 2115–2126, 1998.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellins and light-stimulated seed germination. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 20, p. 369–376, 2002.

YEH, K.C.; LAGARIAS, J.C. Eukaryotic Phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, p. 13976-13981, 1998.

YOSHII, H.; IMASEKI, H. Biosynthesis of auxin-induced ethylene: effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 22, p. 369-379, 1981.

ZOBEL, R.W. Genetics of the *diageotropica* mutant in the tomato. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 63, p. 91-97, 1972.