UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Centro de Energia Nuclear na Agricultura

LILIAN ELLEN PINO-NUNES

Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)

> Piracicaba – SP 2009

LILIAN ELLEN PINO-NUNES Engenheiro Agrônomo

Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)

> Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

> Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres

Piracicaba – SP 2009 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Pino-Nunes, Lilian Ellen

Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) / Lilian Ellen Pino-Nunes; orientador Lázaro Eustáquio Pereira Peres. - - Piracicaba, 2009. 140 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agrobacterium 2. Fisiologia vegetal 3. Hormônios vegetais 4. Mutação genética 5. Organogênese vegetal I. Título

CDU 577.175.1:581.14

Aos meus queridos pais, Caetano e Frederica, pelo amor incondicional, com todo carinho, **DEDICO**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde e pelas oportunidades.

Ao Prof. Dr. Lázaro E. P. Peres, por ser um orientador exemplar, amigo e conselheiro, por tudo que me ensinou nesses anos de convivência e por ter contribuído para o meu crescimento científico e intelectual.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho (Processo nº 04/15268-0).

Ao DAAD (Deutscher Akademischer Austausdienst) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do estágio de doutorado na "Freie Universität Berlin", Alemanha.

Ao CENA, pela oportunidade de realizar o doutorado num centro de pesquisa tão bem conceituado.

Ao Prof. Dr. Thomas Schmülling por ter me recebido tão bem em seu instituto na Alemanha e pelas sugestões dadas para a realização do estágio de doutorado.

Aos queridos amigos do Instituto de Biologia e Genética Aplicada (Berlim): Tomáš Werner, Isabel Bartrina, Michael Riefler, Wolfram Brenner, Ireen Köllmer, Helen Braum, Kerstin Holst, Eswar Reddy, Alexander Heyl e Erika Nehnevajova. Por todos os momentos compartilhados no trabalho, seminários, confraternização e especialmente pelas conversas nos momentos livres. Sie werden immer in meinem Herzen, und ich danke Ihnen für alles.

Aos queridos amigos do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, por ordem de idade (pra não chatear ninguém....rs): Filhão, Tataka, Clarissa, Maloquinha, Mary, Gabriel e Ninfim.

Filhão, valeu por todos esses anos de convivência, pelas conversas, pela amizade e, é claro, eu não poderia deixar de mencionar, por você ter iniciado as introgressões pra mim, vou te dever essa pelo resto da vida.....rs.

Tataka, muito obrigada por todos os momentos divertidos que passamos no laboratório e fora dele, pelas conversas ilárias e também pelas conversas sérias, pelas experiências profissionais e pessoais trocadas, por toda a ajuda que você me deu nessa fase final da tese e pelos inúmeros frutos que você me ajudou a processar! Acima de tudo isso, obrigada por ser uma pessoa tão especial e uma amiga de verdade.

Maloquinha.... que falta você faz aqui no laboratório. Mas foram ótimos os momentos que compartilhei contigo aqui na Esalq. Você é um amigo do peito e tenho certeza que vai fazer muito sucesso mundo afora com esse carisma enorme que você tem!

Mary linda, Mary loka, Mary fofa! Querida estagiária, você foi meu braço direito e esquerdo, não teria conseguido sem a sua ajuda. Obrigada por você ter sido sempre tão prestativa, organizada e "pau pra toda obra"... Claro que não poderia deixar de mencionar nossos momentos insanos, muito divertidos por sinal, que nos ajudaram a distrair a cabeça nos momentos de estresse. Além de tudo isso Mary, obrigada por você ser minha amiga sincera e carinhosa e por me ajudar a "não deixar a peteca cair". Adoro você, lindinha!

Aos amigos que já passaram pelo laboratório: Simone, Joni, Agustin, Juliana, Fernando, Guillermo, Angélica, Joane e Ricardo.

Simone, obrigada pela amizade e por todos os bons momentos de convivência. Está fazendo falta aqui toda a sua energia 220 V, que acelera todo mundo e faz a gente trabalhar a mil por hora....rs.

Ah Gordo, chegou a sua vez! Você é um amigo muito especial, sempre foi como um irmão pra mim, incentivando-me e dando-me forças pra continuar. Obrigada por todos esses anos de amizade verdadeira, pelas nossas conversas, pelos conselhos que você me deu, pelas muitas risadas que demos juntos, e por saber que eu posso contar contigo pra qualquer coisa, mesmo à distância.

Agustin, apesar do seu jeito folgado (não poderia deixar de falar isso, senão não daria pra falar de você....rs), eu gosto muito de ti, argentino! E é claro que me orgulho de ter um amigo tão inteligente. Obrigada pelas nossas boas conversas e pela ajuda, mesmo quando distante. Devo incluir aqui a lembrança da nossa fase "do mal", juntamente com o amigo Gordo Lima, que foi muito boa e nos rendeu boas gargalhadas!

Ju, minha estagiária do coração, que passou pelo laboratório e fez uma diferença enorme pra mim, pois me ajudou muitíssimo na fase inicial deste trabalho. Também não teria conseguido fazer tudo o que fiz sem a sua ajuda. Obrigada por ter sido e ainda ser minha amiga e pelos muitos conselhos que me deu. Admiro muito você, florzinha!

Ao meu amigo José Lázaro, obrigada pelas nossas muitas conversas em todos esses anos de amizade, por todos os conselhos que você me deu e pela força nos momentos mais difíceis.

À Gorda, minha amiga querida. Apesar da vida levar muitos dos castelos que construímos, são nas amizades verdadeiras, como a sua, que encontramos forças pra construir tudo de novo. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos (desde a adolescência) e por eu saber que posso contar contigo, sempre.

Alexon, amigo do peito, às vezes meio de lua (rs), mas sempre verdadeiro, sincero e presente. Obrigada pela amizade compartilhada em todos esses anos, por sempre estar ao meu

lado, por me ouvir (tudo bem que você fala muito mais do que ouve...rs) e pela certeza de sermos sempre amigos, pra tudo.

Aos amigos brasileiros (e alemães) que conheci em Berlin, Mariana e David, Margarete, Mônica e Alexandre, Roni e Rolland, Obner e Malone, Daiane e, mais recentemente, Taty e Thomas. Obrigada por dividirem praticamente todos os finais de semana comigo e por me receberem tão bem no período que passei na Alemanha. Obrigada pelos almoços (e jantas...rs), pelos passeios, pelas risadas que demos juntos e, especialmente, por serem a minha família aí.

Agradeço também aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ, os técnicos Romeu, Miranda e Vitti, por terem me ajudado com os experimentos no laboratório e na casa de vegetação, e o pessoal da secretaria, Lígia, Márcia e Fábio, por me ajudarem a resolver os "pepinos" burocráticos do laboratório.

Às secretárias Neuda e Cláudia, pela prestatividade e eficiência no trabalho desenvolvido junto à Pós-graduação do Cena, obrigada.

À bibliotecária Marília pela disposição na revisão das referências, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto e ao técnico do Laboratório de Melhoramento de Plantas, Paulo Cassieri, pela ajuda com os experimentos de mutagênese.

Aos amigos do prédio da Química, Cometa, K-juru, Selma, Bruna e Polé.

Ao meu irmão querido Wilians, o qual admiro muito e tenho como um exemplo de honestidade, idoneidade e responsabilidade. À minha cunhada Elceli, a qual eu estimo bastante, obrigada por toda a ajuda que você me tem dado. Ao meu sobrinho lindo Guilherme, você é a paixão da titia. Obrigada por vocês existirem na minha vida. Amo vocês.

A todos que, de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram e me incentivaram na realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

PINO-NUNES, L.E. Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxinacitocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom). 2009. 140 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Os hormônios auxina e citocininas são essenciais ao desenvolvimento das plantas, pois controlam os processos de divisão, expansão e diferenciação celular, os quais, por sua vez, influenciam desde a formação do embrião até o amadurecimento dos frutos e senescência. Auxinas e citocininas regulam respostas fisiológicas comuns, sugerindo haver múltiplos mecanismos de interação. Neste trabalho, um modelo para estudar a interação entre auxinas e citocininas no controle do desenvolvimento é proposto, sendo baseado em plantas mutantes e transgênicas, além de duplos mutantes, com alterações na sensibilidade ou metabolismo de auxina e citocinina. O mutante bushy root (brt) foi caracterizado como pouco sensível à citocinina e sugere uma importante função da citocinina no desenvolvimento da semente e na determinação da dominância apical em tomateiro. Os mutantes potato leaf (c) e entire (e)foram introgredidos no "background" Micro-Tom (MT), caracterizados e utilizados para verificar como eles afetam a sensibilidade à auxina e como interferem no desenvolvimento da planta. Esses mutantes foram comparados com MT, com o mutante diageotropica (dgt), que é pouco sensível à auxina, e com os duplos mutantes c dgt e dgt e. A mutação c não alterou a sensibilidade à auxina e estaria influenciando apenas a arquitetura foliar. O mutante e parece ser mais sensível à auxina com relação à capacidade de formar raízes in vitro e partenocarpia. O duplo mutante dgt e mostrou fenótipo aditivo (intermediário), sugerindo que DGT e E agem em vias paralelas na resposta à auxina. Foram criadas linhagens transgênicas com superexpressão da enzima citocinina oxidase de Arabidopsis (35S:AtCKX2), que resulta em plantas com baixos níveis endógenos de citocinina. As linhagens transgênicas (MT CKX2 e dgt CKX2) foram comparadas com MT, brt, dgt e brt dgt. A maioria dos parâmetros que estavam relacionados com o desenvolvimento vegetativo, e todos os parâmetros relacionados ao desenvolvimento reprodutivo, foram associados ao efeito dos níveis absolutos de auxina e citocinina, sendo provavelmente resultantes de alterações nos processos de divisão e expansão celular. A dominância apical e a morfogênese *in vitro* (formação de gemas caulinares e raízes) foram associadas ao efeito do balanço auxina/citocinina, sendo esses processos conhecidamente regulados pelo efeito dessas classes hormonais na diferenciação celular.

Palavras-chave: auxina, citocinina, desenvolvimento, tomateiro, transformação genética

ABSTRACT

PINO-NUNES, L.E. Control of plant development by auxin-cytokinin interactions. A new approach based on tomato (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) mutants. 2009. 140 f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

The plant hormones auxin and cytokinin are crucial for plant development, since they control cell division, expansion and differentiation, which regulate developmental processes starting from embryo formation to fruit ripening and senescence. Auxins and cytokinins usually regulate the same physiological responses, suggesting multiple mechanisms of interaction between these hormones. In this work, a model to study auxin and cytokinin interaction in the control of plant development is proposed, based on mutants, transgenic lines and double mutants with alterations on the auxin and cytokinin sensitivity or metabolism. The bushy root (brt) mutant was characterized as having low cytokinin sensitivity and suggested a relevant function to cytokinin in the seed development and apical dominance in tomato. The potato leaf (c) and entire (e) mutants were introgressed in the Micro-Tom "background", characterized and used to check how they affect the auxin sensitivity and the plant development. The responses from these mutants were compared to MT and *diageotropica* (dgt), which is a low sensitive auxin mutant, and also compared to c dgt and dgt e double mutants. The c mutation did not alter the auxin sensitivity and was only related to leaf architecture. The *e* mutant seemed to be more sensitive to auxin in the *in vitro* root induction and parthenocarpy. The double mutant dgt e showed an additive phenotype, suggesting that DGT and E act in parallel pathways controlling auxin sensitivity. Transgenic lines were generated overexpressing the cytokinin oxidase from Arabidopsis (35S:AtCKX2), which renders plants with low endogenous cytokinin levels. Transgenic lines (MT CKX2 and dgt CKX2) were compared to MT, brt, dgt and brt dgt. Most of the traits related to vegetative development and all traits related to reproductive development were linked to the effect of auxin and cytokinin absolute levels, probably reflecting to the effect of these hormones in cell division and expansion. Apical dominance and in vitro morphogenesis (shoot and root formation) were linked to the auxin-to-cytokinin ratio, since these processes are well known to be regulated by the effect of these two hormones in cell differentiation.

Keywords: auxin, cytokinin, development, tomato, genetic transformation

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Auxinas2.2 Citocininas2.3 Interação auxina-citocinina e desenvolvimento	16 19 24
3. OBJETIVOS	27
4. <i>bushy root</i> : UM MUTANTE DE TOMATEIRO COM DOMINÂNCIA APICA FOLIAR, TAMANHO DA SEMENTE E SENSIBILIDADE À CITOCININA RE	L, ÁREA EDUZIDOS 28
 4.1 Introdução 4.2 Material e Métodos	30 31 31 31 32 32 32 33 33 34 35 36
5. ANÁLISES DE RESPOSTA À AUXINA NOS MUTANTES DE TOMATEIR potato leaf	O entire E 53
 5.1 Introdução 5.2 Material e Métodos	55 57 57 58 58 58 58 58 59 59 59 60

SUMÁRIO

5.3.1 Introgressão das mutações no "background" MT e obtenção dos duplos mutante	es 60
5.3.2 Caracterização dos mutantes e duplos mutantes	61
5.3.3 Sensibilidade à auxina	65
5.3.4 Auxina e respostas à partenocarpia e gravitropismo	70
5.4 Conclusões	73
6 CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL PELO BALANÇO AUXINA-	
CITOCININA E PELO NÍVEL ABSOLUTO DE CADA HORMÔNIO: MUTANTES,	
DUPLOS MUTANTES E PLANTAS TRANSGENICAS DE TOMATEIRO COMO	
MODELO	74
	76
6.1 Introdução	/6
6.2 Material e Metodos	/ /
6.2.1 Material vegetal e obtenção de duplos mutantes	/ /
6.2.2 Obtenção de plantas transgênicas de tomateiro superexpressando AtCKX2	
6.2.3 Análises relacionadas ao desenvolvimento vegetativo	78
6.2.4 Análises relacionadas ao desenvolvimento reprodutivo	78
6.2.5 Análises relacionadas à morfogênese <i>in vitro</i>	79
6.3 Resultados e Discussão	80
6.3.1 Obtenção de plantas transgênicas de tomateiro superexpressando AtCKX2	80
6.3.2 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço no	
desenvolvimento vegetativo	82
6.3.3 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço no	
desenvolvimento reprodutivo	88
6.3.4 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço em	
características agronômicas	91
6.3.5 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço na	
morfogênese	93
6.4 Conclusão	97
7 CONCLUSÕES FINAIS	98
	70
REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO

As plantas utilizam uma ampla variedade de hormônios, incluindo esteróides e peptídios, assim como as 5 classes de hormônios vegetais clássicas (auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e giberelinas), os quais são moléculas relativamente pequenas (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). Auxinas e citocininas merecem destaque nos estudos sobre hormônios vegetais e desenvolvimento, já que diferem dos demais hormônios e agentes de sinalização em um aspecto importante: elas são estritamente necessárias para a viabilidade. Conseqüentemente, nenhum mutante com deficiência total em auxina ou citocinina tem sido encontrado, sugerindo que as mutações que eliminam tais hormônios são letais. Enquanto os demais hormônios vegetais parecem agir como chaves liga-desliga, reguladoras dos processos específicos do desenvolvimento, auxinas e citocininas parecem ser necessárias, em certo nível, mais ou menos continuamente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O papel das auxinas e citocininas no controle do desenvolvimento é uma questão antiga. Mais de 50 anos se passaram desde a descoberta de que tanto auxina quanto citocinina são necessárias para o desenvolvimento inicial da planta em cultura *in vitro* (SKOOG; MILLER, 1957). Estudos subseqüentes em plantas inteiras e em tecidos excisados demonstraram a existência de interações sinergísticas, antagônicas e aditivas entre esses dois hormônios. Complementando essa complexidade, o modo de interação entre auxina e citocinina é, normalmente, dependente da espécie e do tipo de tecido. Isso tem dificultado o desenvolvimento de um modelo geral para o controle do crescimento e diferenciação por esses hormônios.

O uso do tomateiro em estudos fisiológicos e genéticos possibilita explorar o controle do desenvolvimento pelos hormônios, já que são disponíveis mutantes para essas substâncias. Uma vantagem de se utilizar tomateiro como modelo é sua importância no mercado de frutos frescos e na indústria de alimentos processados (RICK; YODER, 1988). Além disso, o tomateiro pertence à família Solanaceae, a qual compreende muitas culturas importantes para a agricultura, incluindo tomateiro, batata, tabaco, pimenta e berinjela. Para estudos de genética e genômica, o tomateiro tem muitas vantagens em relação às outras espécies cultivadas e de interesse agronômico, como o tamanho moderado de seu genoma diplóide (950 Mb, n = 12), tendo numerosas variações alélicas já mapeadas (TANKSLEY et al., 1992; TANKSLEY, 1993), marcadores de DNA (VAN DER HOEVEN et al., 2002), coleções abundantes de germoplasma e mutantes (MENDA; SEMEL; PELED, 2004; PINO-NUNES et al., 2009), e um número crescente de seqüências expressas – ESTs (YAMAMOTO et al.,

2005). Essas vantagens têm feito do tomateiro um excelente modelo para estudar o desenvolvimento do fruto (GILLASPY; BEN-DAVID, GRUISSEM, 1993; GIOVANNONI, 2004), processos de amadurecimento (WILKINSON et al., 1995; GIOVANNONI, 2004, 2007; ALBA et al., 2005), metabolismo de açúcar (OHYAMA et al., 1995; CARRARI et al., 2006), biossíntese de carotenóides (BRAMLEY, 2002; ISAACSON et al., 2002), análises de QTLs (DE VICENTE; TANKSLEY, 1993; FRARY et al., 2000) e interações plantamicroorganismo (SALMERON et al., 1996; PEDLEY; MARTIN, 2003; ZSÖGÖN et al., 2008).

Aspectos do desenvolvimento da planta que são controlados por hormônios, como arquitetura foliar (HAREVEN et al., 1996), dominância apical (SCHUMACHER et al., 1999), abscisão de órgãos (MAO et al., 2000) e organogênese (KOORNNEEF et al., 1993, LIMA et al., 2004, 2009) têm sido "endereçados" usando mutantes induzidos ou variação genética natural em tomateiro. Uma vantagem adicional para o uso dessa espécie como modelo genético é a introdução da cultivar miniatura Micro-Tom (MT), a qual foi obtida inicialmente como planta ornamental pelo cruzamento das cultivares Florida Basket e Ohio 4013-3 (46). A partir dos últimos anos da década de 90, MT têm recebido atenção como uma cultivar modelo para pesquisas em tomateiro. Comparado a outras cultivares, MT tem vários recursos favoráveis, como o tamanho reduzido (15-20 cm, quando cultivado em vasos de 150 mL), ciclo rápido (70-90 dias) e de fácil transformação (Apêndice B). Adicionalmente, MT apresenta fertilidade e pegamento do fruto relativamente altos, mesmo sob iluminação artificial em laboratório. MEISSNER et al. (1997) mostraram que MT pode crescer em alta densidade (até 1.357 indivíduos/m2) e pode produzir três a quatro gerações por ano. Esses fatores, nos quais a maioria das cultivares comuns de tomateiro falham, permitem utilizar MT da mesma maneira que Arabidopsis, tornando-o adequado para mutagênese (MEISSNER et al., 2000; MATHEWS et al., 2003; WATANABE et al., 2007; MATSUKURA et al., 2007; PINO-NUNES et al., 2009) e transformação genética (PARK et al., 2003; DAN et al., 2006; SUN et al., 2006; QIU et al., 2007).

Neste trabalho, foi utilizado um modelo para estudar a interação entre auxinas e citocininas no controle do desenvolvimento, baseado em plantas mutantes e transgênicas, todas no mesmo background genético (cv. MT), além de duplos mutantes, com alterações na sensibilidade ou metabolismo de auxina e citocinina. Foram utilizados os genótipos mutantes já existentes: *brt* (pouco sensível à citocinina, PINO-NUNES, 2005) e *dgt* (pouco sensível à auxina, OH; IVANCHENKO; WHITE, 2005). Foram criados os genótipos transgênicos *MT CKX2* (baixos níveis endógenos de citocinina) e *dgt CKX2* (duplo mutante com pouca

sensibilidade à auxina e baixos níveis endógenos de citocinina) e o duplo mutante *brt dgt* (pouca sensibilidade à auxina e citocinina). A análise de parâmetros que afetam o desenvolvimento das plantas nesses genótipos permitiu inferir quais respostas de desenvolvimento seriam controladas pelos níveis absolutos de auxina e citocinina, e quais respostas seriam controladas pelo balanço entre essas duas classes hormonais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os hormônios vegetais são substâncias químicas que regulam o desenvolvimento das plantas influenciando processos fisiológicos, e são ativos em baixas concentrações (DAVIES, 1995). O termo "hormônio" deriva do grego e significa "estímulo". Seu uso original em fisiologia vegetal derivou do conceito de hormônio animal, envolvendo um local específico de síntese, transporte pelo sistema vascular até um tecido alvo, e o controle de uma resposta fisiológica no tecido alvo através da concentração do hormônio (TREWAVAS; CLELAND, 1983).

A primeira evidência de um hormônio vegetal ocorreu no final do século XIX a partir dos experimentos de Charles e Francis Darwin, publicados no livro "O poder do movimento nas plantas", onde eles verificaram o fototropismo em coleóptilos de plântulas de alpiste (*Phalaris canariensis*). Esses experimentos indicaram que algum tipo de sinal era produzido no ápice e deslocava-se até a zona de crescimento, provocando o crescimento mais rápido do lado sombreado do que o lado iluminado (TAIZ; ZEIGER, 2004). Somente 45 anos mais tarde, em 1926, esse mensageiro foi isolado em tecidos vegetais, onde foi permitido que ele se difundisse através de blocos de ágar, os quais retiveram então uma atividade promotora de crescimento (CHOLODNY, 1926; WENT, 1926). A partir daí os hormônios vegetais foram sendo descobertos e estudados.

As plantas utilizam uma ampla variedade de hormônios, incluindo esteróides e peptídios, assim como as 5 classes de hormônios vegetais clássicas (auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e giberelinas), os quais são moléculas relativamente pequenas (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006). Auxinas e citocininas merecem destaque nos estudos sobre hormônios vegetais e desenvolvimento, já que diferem dos demais hormônios e agentes de sinalização em um aspecto importante: elas são estritamente necessárias para a viabilidade. Conseqüentemente, nenhum mutante com deficiência total em auxina ou citocinina tem sido encontrado, sugerindo que as mutações que eliminam tais hormônios são letais. Enquanto os demais hormônios vegetais parecem agir como chaves liga-desliga, reguladoras dos processos específicos do desenvolvimento, auxinas e citocininas parecem ser necessárias, em certo nível, mais ou menos continuamente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.1 Auxinas

Em meados de 1930 a primeira auxina foi identificada, o ácido indol-3-acético (AIA), que é a auxina mais abundante e de maior relevância fisiológica (TAIZ; ZEIGER, 2004). Atualmente auxina é um nome genérico para um importante grupo de moléculas em plantas, as quais podem ser também encontradas em humanos, animais e microrganismos. AIA é um hormônio essencial às plantas, com grande habilidade para regular muitos aspectos do desenvolvimento. Algumas auxinas sintéticas são ainda importantes herbicidas, como por exemplo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que é um dos herbicidas mais usados no mundo. O efeito da auxina sobre o crescimento das plantas depende do tipo de auxina aplicada e sua concentração (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006).

Auxinas controlam e/ou interferem em muitos processos do desenvolvimento. Auxinas estimulam divisão, expansão e diferenciação (BERLETH; SACHS, 2001; HOBBIE, 1998), embora sua ação exata em cada um desses processos ainda não seja totalmente compreendida. Auxinas estimulam a diferenciação de tecidos vasculares (CARLAND et al., 1999; GÄLWEILER et al., 1998; YE, 2002), a iniciação de raízes em estacas caulinares (ROSIER et al., 2004; STEFANCIC; STAMPAR; OSTERC, 2006), o desenvolvimento de raízes laterais (CASIMIRO et al., 2001) e a diferenciação de raízes em cultura de tecidos (NANDAGOPAL; RANJITHA KUMARI, 2007; WANG et al., 2005). Auxinas mediam a formação do eixo apical/basal (FRIML et al., 2003), respostas de tropismos (gravitropismo e fototropismo) em caules e raízes (LUSCHNIG et al., 1998; MARCHANT et al., 1999; NOH et al., 2003) e de dominância apical (BOOKER; CHATFIELD; LEYSER, 2003), levam a atraso na senescência foliar (ELLIS et al., 2005; GAN, 2004; LIM; KIM; NAM, 2007) e podem inibir ou promover (via etileno) a abscisão de folhas (SUTTLE; HULTSTRAND, 1991) e frutos (BROWN, 1997). Em alguns frutos, auxinas induzem o pegamento e o crescimento destes (SERRANI et al., 2007). Auxinas regulam ainda a partição de assimilados (LENTON, 1984), promovem atraso no amadurecimento de frutos (DAVIES; BOSS; ROBINSON, 1997), promovem o florescimento em algumas espécies (SALISBURY, 1955) e estimulam o crescimento de alguns órgãos florais (BENNETT et al., 1995; NEMHAUSER; FELDMAN; ZAMBRYSKI, 2000; OKADA et al., 1991; VERNOUX et al., 2000).

O modo de ação das auxinas vem sendo estudado desde muitos anos atrás. Finalmente, depois de décadas de pesquisas, duas abordagens diferentes renderam informações importantes sobre a natureza da ação das auxinas. A primeira abordagem era baseada na observação feita há mais de 20 anos atrás, a qual mostrou que a auxina altera a expressão de

genes em minutos de maneira dramática e seletiva (ABEL; THEOLOGIS, 1996; KEY; BARNETT; LIN, 1967; THEOLOGIS; RAY, 1982; THEOLOGIS; HUYNH; DAVIS, 1985). A segunda abordagem era baseada na análise de uma série de mutações insensíveis à auxina. Em muitas dessas diferentes plantas mutantes, faltavam componentes funcionais da via proteolítica mediada pela ubiquitina, indicando que a degradação seletiva de proteínas é um regulador crucial de muitos aspectos de respostas à auxina (DEL POZO et al., 1998; DEL POZO; ESTELLE, 1999; LEYSER et al., 1993).

Enquanto os níveis de alguns mRNAs diminuem muitas vezes em resposta à auxina, os níveis de outros mRNAs aumentam muitas vezes, como por exemplo, Aux/IAA, GRETCHENHAGEN-3 (GH3) e membros da pequena família gênica SAUR (ABEL; THEOLOGIS, 1996; HAGEN; GUILFOYLE, 1985; MCCLURE; GUILFOYLE, 1987). Além disso, auxina ativa "regulons" direta e rapidamente. Os genes que são ativados ou reprimidos durante esse processo são, por fim, responsáveis por muitos efeitos fisiológicos da auxina. As respostas à auxina são mediadas por 2 grupos de genes: os genes Aux/IAA e os genes ARF (REMINGTON at al., 2004). Proteínas Aux/IAA funcionam como reguladores negativos da expressão gênica (ULMASOV; HAGEN; GUILFOYLE, 1997). Membros da família de fatores de resposta à auxina (ARFs, Auxin Response Factors) são fatores de transcrição que se ligam à elementos de resposta à auxina (AREs, Auxin-Responsive Elements) nos promotores dos genes de respostas primárias, mediando sua transcrição.

Um dos avanços mais importantes da biologia vegetal dos últimos anos foi a identificação da proteína do tipo F-box TIR1 como um receptor de auxina (DHARMASIRI; DHARMASIRI; ESTELLE, 2005; KEPINSKI; LEYSER, 2005). Duas observações cruciais que levaram a essa descoberta foram que a auxina aumenta a interação entre TIR1 e Aux/IAAs (DHARMASIRI et al., 2003) e que o pré-tratamento de TIR1 com auxina aumenta sua ligação aos genes Aux/IAA (GRAY et al., 2001; KEPINSKI; LEYSER, 2004). Dois outros estudos recentes mostraram que a auxina estabiliza a interação entre TIR1 e os Aux/IAAs, que auxina é continuamente necessária para para esse efeito e que SCF^{TIR1} se liga à auxina diretamente com a constante de dissociação entre 20 e 80 nM (DHARMASIRI; DHARMASIRI; ESTELLE, 2005; KEPINSKI; LEYSER, 2005). A auxina se liga ao complexo SCF^{TIR1} e induz a destruição dos Aux/IAAs pelo complexo proteossômico. Os Aux/IAA são repressores de genes que possuem elementos de resposta à auxina (AREs), os quais são estimulados pelos fatores de transcrição de resposta à auxina (ARFs). Na ausência dessa repressão, os AREs são reconhecidos pelos ARFs e desencadeiam a produção do mRNA que resultará posteriormente na resposta fisiológica. Pode-se concluir que SCF^{TIR1} e o

mecanismo de degradação de proteína, juntamente com Aux/IAAs e ARFs, representam a cascata completa de transdução de sinal desde o sinal de auxina até a expressão gênica, e que essas proteínas F-box representam uma nova classe de receptores para auxina (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006).

A sinalização de auxina mediada por Aux/IAA e ARE provavelmente não é a única via pela qual a auxina age. Muitos estudos fornecem fortes razões para isso: auxinas impermeáveis mostram efeitos sem ao menos entrar na célula (VENIS et al., 1990), ou na qual as respostas à auxina são simplesmente muito rápidas para ser mediada pela transcrição gênica, por exemplo na despolarização da membrana (FELLE; PETERS; PALME, 1991). Décadas de pesquisas têm mostrado que auxina controla muitos processos celulares, embora algumas respostas indicarem que elas podem não ser objeto do controle transcricional. Os efeitos da auxina na abundância e atividade da H⁺-ATPase localizada na membrana plasmática são bastante estudados (FRIAS et al., 1996; RÜCK et al., 1993). Outros alvos regulatórios são os canais de cloro e potássio e os transportadores de absorção de cloro (BLATT; THIEL, 1994; ZIMMERMANN et al., 1994). Esse estímulo na absorção de íons controlado pela auxina está relacionado com a idéia de que a auxina tanto controla quanto sustenta a pressão de turgor intracelular que é necessária para a expansão da célula (EVANS, 1985).

A via de desenvolvimento a ser tomada pelos tecidos das plantas pode ser determinada pela sensibilidade das células à auxina, a concentração de auxina ativa e as concentrações relativas de outros hormônios. Isso pode variar amplamente em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento. Auxina é prontamente conjugada a uma ampla variedade de moléculas, o que a torna inativa. De fato, a maior parte do AIA na planta está na forma de conjugados inativos. A conjugação e o catabolismo da auxina pode, assim, diminuir os níveis de auxina ativa. A síntese *de novo* e a hidrólise de conjugados contribuem para a regulação da homeostase pelo aumento dos níveis de auxina ativa (LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2001; LJUNG et al., 2002, 2005). Auxinas são sintetizadas não somente em tecidos jovens da parte aérea, mas também em raízes, particularmente no ápice meristemático da raiz primária (LJUNG et al., 2005). Auxina é sintetizada a partir do indol através de vias dependente e independente do triptofano (WOODWARD; BARTEL, 2005).

A distribuição de auxina ocorre de maneira específica e ativa. O padrão de uma resposta à auxina não é tão determinado pelos níveis relativos de síntese e catabolismo quanto o é pela capacidade de influxo e efluxo de auxina pelas células. Embora as taxas de síntese e conjugação sejam indiscutivelmente importantes para a condição total de auxina na planta, é o

seu estrito gradiente de concentração através de apenas algumas células que têm um poderoso efeito no desenvolvimento das plantas. Essas observações têm tornado o transporte de auxina um dos tópicos mais estudados em termos de desenvolvimento vegetal. A redistribuição de auxina envolve muitas proteínas (BENNETT et al., 1996; FRIML et al., 2002; FRIML, 2003; GÄLWEILER et al., 1998; NOH; MURPHY; SPALDING, 2001) e, dentre elas, a mais investigada pertence à família de proteínas localizadas polarmente na membrana plasmática, as proteínas PIN. Essas proteínas são encontradas por toda a parte no reino vegetal (PAPONOV et al., 2005) e são responsáveis pelo efluxo de auxina (BLILOU et al., 2005; FRIML et al., 2002; GÄLWEILER et al., 1998; PAPONOV et al., 2005). Em distâncias curtas, o transporte de auxina via proteínas PIN controla muitos processos nas plantas, incluindo o desenvolvimento de raízes e organogênese (FRIML, 2003; REINHARDT et al., 2003).

Vários mutantes de auxina já foram identificados em *Arabidopsis: sur1* (BOERJAM et al., 1995), *ilr1* (BARTEL; FINK, 1995), *aux1* (BENNETT et al., 1996), *axr1* (TIMPTE et al., 1995), *axr3* (ROUSE et al., 1998), *axr2* (TIAN; REED, 1999), *shy2* (NAGPAL et al., 2000), *tir1* (GRAY et al., 1999) e *tir3* (RUEGGER et al., 1997), entre outros. Em tomateiro, apenas o mutante *dgt* foi identificado como insensível à auxina (KELLY; BRADFORD, 1986).

2.2 Citocininas

Nas décadas de 40 e 50, uma grande variedade de substâncias que poderiam iniciar e manter a proliferação de tecidos vegetais meristemáticos em cultura foram identificadas, e vão desde o extrato de levedura até o suco de tomate. O leite de côco, que é um líquido endospérmico, mostrou ter efeito positivo mais acentuado (CAPLIN; STEWARD, 1948), indicando que ele continha uma ou mais substâncias que poderiam estimular a divisão celular. Na década de 50, Skoog e Miller descobriram que DNA de esperma de arenque autoclavado era um potente ativador da proliferação de células da medula de tabaco (MILLER et al., 1955; MILLER et al., 1956). Eles identificaram uma adenina derivativa, 6-furfurilaminopurina, como sendo esse composto ativo, o qual foi nomeado de cinetina. Mais tarde, a zeatina foi identificada em endosperma de milho imaturo como a primeira citocinina de ocorrência natural (LETHAM, 1973) e foi revelada ser ela a citocinina abundante encontrada no leite de côco.

Desde sua descoberta, citocininas têm sido relacionadas com quase todos os aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo divisão celular, iniciação e crescimento do caule,

senescência foliar e fotomorfogênese (MOK, 1994). Citocininas também regulam o desenvolvimento das sementes (RIEFLER et al., 2006) e estresse abiótico (TRAN et al., 2007). Níveis endógenos reduzidos de citocinina inibem o desenvolvimento do caule e aumentam o crescimento e ramificação das raízes (WERNER et al., 2001), enquanto elevados níveis de citocinina podem levar a redução na dominância apical e no desenvolvimento radicular, atraso na senescência e aumento na regeneração in vitro (GAN; AMASINO, 1995; LI; HAGEN; GUILFOYLE, 1992; MEDFORD et al., 1989; SMIGOCKI, 1991; ZUBKO et al., 2002). O tratamento de gemas laterais com citocinina causa quebra de dormência e o crescimento delas (PHILLIPS, 1975). A aplicação de citocinina em plantas inteiras ou em folhas destacadas tente a atrasar a senescência (GAN; AMASINO, 1996). Citocininas podem induzir a expressão de muitos genes regulados pela luz (CHEN et al., 1993; CROWELL; AMASINO, 1994). Plântulas estioladas crescidas na presença de citocinina adotam uma morfologia similar a plântulas crescidas na luz (CHORY et al., 1994). Citocininas influenciam ainda relações fonte/dreno, germinação, formação de tecidos vasculares e expansão do cotilédone em muitas espécies (MOK, 1994).

As citocininas de ocorrência natural são derivadas de adeninas com distintas substituições ligadas à posição do carbono 6 da molécula (KIEBER, 2002). Algumas feniluréias, como o thidiazuron, também possuem atividade citocinínica (THOMAS; KATTERMAN, 1986). A classe mais comum de citocininas possui cadeias laterais de isoprenóides, incluindo a citocinina mais abundante em *Arabidopsis*, trans-zeatina. Nas plantas superiores, a zeatina ocorre tanto na forma *cis* quanto na forma *trans*, e essas formas podem ser interconvertidas por uma enzima conhecida como zeatina isomerase. Enquanto a maioria dos efeitos da zeatina têm sido atribuída à forma trans, já se tem resultado de que a forma *cis* também pode ser biologicamente ativa (MARTIN et al., 2001).

Várias outras citocininas com estruturas semelhantes são conhecidas atualmente. Citocininas estão presentes em todos os tecidos vegetais, sendo abundantes em ápices radiculares e caulinares e em sementes imaturas. Citocininas podem atuar em longas distâncias ou nas proximidades das células onde são produzidas, ou mesmo nas próprias células que as produzem (SCHMÜLLING, 2004). Citocininas são também produzidas por cianobactérias (STIRK; ÖRDÖG; STADEN, 1999; YEVDAKOVA et al., 2008), por algumas bactérias fitopatogênicas como *Agrobacterium tumefaciens* (AKIYOSHI; REGIER; GORDON, 1987; SAKAKIBARA et al., 2005), *Pseudomonas savastanoi* (AKIYOSHI; REGIER; GORDON, 1987) e *Rhodococcus fascians* (PERTRY et al., 2008), e pelo fungo *Dictyostelium discoideum* (TAYA; TANAKA; NISHIMURA, 1978).

Há muito tempo se acreditava que a biossíntese de citocinina em plantas e microorganismos se dá inicialmente pela conversão de AMP e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) para a forma ativa da citocinina iPMP (isopenteniladenosina-5'-monofosfato). Essa atividade enzimática foi primeiramente identificada em Cictyostelium discoideum (TAYA; TANAKA; NISHIMURA, 1978). Posteriormente, verificou-se que o gene ipt de Agrobacterium tumefaciens codifica uma enzima com atividade similar (AKIYOSHI et al., 1984). Em Arabidopsis, as enzimas IPT são codificadas por uma pequena família gênica com 7 membros (AtIPT1, AtIPT3-AtIPT8). Esses genes são expressos em tecidos específicos de raízes e caules (i.e. tecidos vasculares), indicando que a biossíntese de citocinina ocorre em todos os órgãos principais da planta (SCHMÜLLING, 2004). Hoje, sabe-se que a via de biossínese de citocinina em plantas, mediadas pelos genes AtIPT1, AtIPT3-AtIPT8, utiliza ADP ou ATP, que se liga ao IPP (isopentenil pirofosfato) e forma iPRMP (iP ribosídeo 5'monofosfato), o qual é então convertido a tZRMP (trans-zeatina ribosídeo 5'-monofosfato) pelas enzimas mono-oxigenases P450, e finalmente a trans-zeatina, uma citocinina ativa em plantas (TAKEI; SAKAKIBARA; SYGIYAMA, 2001). Por outro lado, quando plantas expressam o gene ipt, vindo de Agrobacterium, os precursores são HMBDP e AMP, o que produz trans-zeatina diretamente e dispensa a presença de monoxigenases (SAKAKIBARA et al., 2005)

Citocininas podem ser conjugadas para formar um glicosídeo no qual uma molécula de açúcar, normalmente glicose, está vinculada a um anel purínico (na posição N^3 , N^7 ou N^9), ou ao oxigênio da cadeia lateral da zeatina ou da di-hidrozeatina. (KIEBER, 2002). Além da conjugação, outro mecanismo de controle dos níveis endógenos de citocinina é a degradação. Muitos tecidos vegetais contêm citocininas oxidases, que são enzimas que degradam as cadeias da posição N^6 (JONES; SCHREIBER, 1997). As citocininas trans-zeatina e iP têm cadeias laterais N^6 insaturadas e são degradadas, enquanto di-hidrozeatina e BAP (6-benzilamino purina) são resistentes à clivagem da citocinina oxidase (MOK; MOK, 2001).

Embora as citocininas sejam produzidas em diferentes órgãos, o principal local de sua biossíntese é representado pelas raízes, de onde são transportadas para o caule pelo xilema. A análise da seiva bruta em várias plantas tem demonstrado a presença de citocininas em boas quantidades, destacando-se dentre elas a zeatina ribosídeo. Dessa forma, supõe-se que as citocininas são transportadas principalmente pelo xilema sob a forma de ribosídeos (LETHAM; PALNI, 1983). Em menor proporção, as citocininas podem ainda ser transportadas na direção oposta, da parte aérea para as raízes, através do floema. As

raiz e da parte aérea, como por exemplo levando informações sobre a disponibilidade de nutrientes (SCHMÜLLING, 2004).

A via de transdução de sinal de citocinina é uma via de fosforilação similar ao sistema de dois componentes presente em bactérias. Esse sistema é a principal rota pela qual as bactérias percebem e respondem aos sinais do ambiente (WEST; STOCK, 2001) e geralmente consiste de um sensor do tipo kinase, que percebe o estímulo do ambiente, e de um regulador de resposta que propaga o sinal, freqüentemente regulando diretamente a transcrição de genes alvos (KIEBER, 2002). Genes que codificam proteínas similares a vários elementos do sistema bacteriano de dois componentes são encontrados no genoma de Arabidopsis. Esses genes formam famílias gênicas e incluem histidinas kinases, proteínas de fosfotransferência de histidina (AHPs) e reguladores de resposta (ARRs). A família gênica ARR é dividida em dois grupos, chamados de tipo A e tipo B, os quais diferem em sua seqüência e estrutura de domínio receptor (BRANDSTATTER; KIEBER, 1998; IMAMURA et al., 1999). As taxas de transcrição da maioria dos ARRs do tipo A (ARR4, ARR5, ARR6 E ARR7), mas não os do tipo B (ARR1, ARR2 e ARR10), são induzidas rápida e especificamente em resposta à citocinina endógena, e essa indução ocorre na ausência da síntese de novo de proteína (D'AGOSTINO; DERUÈRE; KIEBER, 2000; TANIGUCHI et al., 1998). A transcrição de ARRs do tipo A é regulada, em parte, pelos ARRs do tipo B (HWANG; SHEEN, 2001; SAKAI et al., 2001). Em Arabidopsis, a sinalização de citocinina é percebida por três sensores histidina kinase, AHK2, AHK3 e CRE1/AHK4 (INOUE et al., 2001; SUZUKI et al., 2001; UEGUCHI et al., 2001; YAMADA et al., 2001). No lado citoplasmático predito, esses três receptores contêm um domínio catalítico do tipo histidina kinase. No domínio transmembranar há um regulador de resposta C-terminal contendo um ligante de citocinina. O modelo atual de sinalização de citocinina prediz que os receptores alimentam o sistema de sinalização de dois componentes, o qual transfere o sinal via fosforilação para o núcleo (FERREIRA; KIEBER, 2005; HEYL; SCHMÜLLING, 2003).

A maior parte das pesquisas feitas para determinar o papel das citocininas no desenvolvimento tem sido focada em analisar os efeitos da aplicação de citocinina. Esses estudos têm usado diferentes espécies e delineamentos experimentais, tornando difícil a comparação em alguns casos. Além disso, não é sempre evidente que os efeitos do hormônio aplicado são indicativos da atual função fisiológica do hormônio. Para evitar esses problemas, os níveis endógenos de citocinina têm sido alterados pela criação de plantas transgênicas expressando o gene *ipt* de *Agrobacterium* sobre o controle de vários promotores (AINLEY; KEY, 1993; ESTRUCH et al., 1991; KLEE, 1994; LI; HAGEN; GUILFOYLE, 1992;

MEDFORD et al., 1989; SCHMÜLLING et al., 1989; SMART et al., 1991; SMIGOCKI; OWENS, 1988; SMIGOCKI, 1991).

Plantas com reduzido conteúdo de citocinina podem também ser muito informativas sobre o papel das citocininas, pois a falta de citocinina pode causar um fenótipo de perda de função para traços fisiológicos e de desenvolvimento nos quais as citocininas são limitantes. No passado, por causa da falta de mutantes específicos e ferramentas bioquímicas, não era possível analisar plantas deficientes em citocinina (FAURE; HOWELL, 1999). A enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) catalisa a degradação irreversível de citocininas e em muitas plantas é responsável pela maioria da inativação metabólica de citocinina (MOK; MOK, 2001). A superexpressão de *AtCKX* em plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* reduziu os níveis endógenos de citocinina e influenciou profundamente o desenvolvimento caulinar e radicular das plantas (WERNER et al., 2001, 2003).

O meristema apical caulinar (Shoot Apical Meristem, SAM) também é influenciado pela ação das citocininas. Um dos mecanismos pelo qual a citocinina pode influenciar o desenvolvimento do SAM é através da regulação da expressão de fatores de transcrição do tipo homeobox. Subconjuntos dos genes homeobox KNOTTED1 (KN1) são expressos exclusivamente no SAM e estão envolvidos no seu desenvolvimento e manutenção (JACKSON; VELT; HAKE, 1994; KERSTETTER; HAKE, 1997). Plantas transgênicas que têm elevados níveis de citocinina, resultante da superexpressão do gene *ipt*, têm algumas características que lembram plantas transgênicas superexpressando *kn1*, como atraso na senescência, dominância apical e formação ectópica de gemas caulinares. Isso sugere que elevados níveis de citocinina podem induzir a expressão de *kn1*, que é de fato o que acontece com *Arabidopsis* (RUPP et al., 1999). Esses resultados sugerem que citocininas podem agir "upstream" a homeoboxes como *KNAT1* e *STM* na regulação do desenvolvimento do meristema apical caulinar (KIEBER, 2002). Por outro lado, citocininas agem também "downstream", já que plantas com superexpressão de *KNAT1* produzem mais citocinina (FRUGIS et al., 2001), a qual também controla o desenvolvimento do meristema.

Assim como para auxina, vários mutantes em citocinina já foram identificados em *Arabidopsis: amp1* (CHAUDHURY et al., 1993), *cyr* (DEIKMAN; ULRICH, 1995); *cri1* (SANTONI et al., 1997), *hoc* (HELLIWELL et al., 2001), *ire1* (CARY et al., 2001), *cre1* (INOUE et al., 2001), *ahk2* e *ahk3* (RIEFLER et al., 2006) e *cnr1* (LAXMI et al., 2006). Em tomateiro, apenas o mutante *brt* foi caracterizado como pouco sensível à citoninina (PINO-NUNES, 2005).

2.3 Interação auxina-citocinina e desenvolvimento

Plantas têm desenvolvido uma complexa rede de sinalização para perceber e responder aos sinais do ambiente. Invariavelmente, esses sinais estão envolvidos com hormônios vegetais. Como já mencionado no início deste capítulo, auxinas e citocininas são hormônios essenciais às plantas, desde o início de seu desenvolvimento, pois afetam os processos celulares de divisão, expansão e diferenciação. O balanço auxina-citonina determina o tipo de órgão a ser formado a partir de calos indiferenciados cultivados in vitro: calos cultivados em meio com alta razão citocinina/auxina normalmente produzem muitas gemas caulinares e poucas raízes, enquanto calos cultivados em meio com baixa razão citocinina/auxina normalmente produzem poucas gemas caulinares e muitas raízes. Concentrações balanceadas entre esses dois hormônios resultam na proliferação de calos indiferenciados (SKOOG; MILLER, 1957). Similarmente, em plantas intactas, a razão entre os níveis endógenos desses hormônios regula a formação de gemas e a dominância apical (KLEE; ESTELLE, 1991; MEDFORD et al., 1989; WICKSON; THIMANN, 1958).

Recentemente, Pernisová et al. (2009) estudaram a interação entre auxina e citoninina no controle do desenvolvimento das plantas em experimentos de organogênese *in vitro*. As citocininas modularam a organogênese *de novo* induzida por auxinas via sinalização de dois componentes e afetaram a distribuição de auxina durante esse processo. Neste último, a citocinina afetou a expressão dos genes PIN, que são carreadores de efluxo. A organogênese induzida por auxina foi acompanhada pela produção de citocininas e pela ativação na sinalização de citoninina (por exemplo os genes de resposta à citocinina do tipo A, ARR). Em contraste com a citocinina, auxina foi capaz de induzir a organogênese *de novo* em explantes hipocotiledonares (PERNISOVÁ et al., 2009). Esses resultados estão de acordo com o recente reconhecimento da auxina e/ou seus gradientes como um iniciador geral para a mudança no programa de desenvolvimento nas plantas (DUBROVSKY et al., 2008; VIETEN et al., 2007).

Além da formação de órgãos *in vivo* e *in vitro*, a dominância apical é um dos eventos clássicos do desenvolvimento que se acredita ser controlado pela interação entre auxina e citocinina. Essa idéia é suportada pelas observações fenotípicas em muitos mutantes de *Arabidopsis* deficientes na biossíntese ou sensibilidade à auxina e/ou citocinina (CATTEROU et al., 2002; HOBBIE, ESTELLE, 1994), bem como em plantas transgênicas com níveis alterados de auxina ou citocinina (EKLÖF et al., 2000; WERNER et al., 2003; ZHANG et al., 1995). A auxina, derivada do ápice caulinar, inibe o crescimento de gemas axilares enquanto a citocinina, normalmente derivada das raízes, promove esse crescimento (CLINE, 1991;

LEYSER, 2003; SHIMIZU-SATO; MORI, 2001). Experimentos com ervilha (*Pisum sativum* L.) mostraram que a auxina regula negativamente a biossíntese local de citocinina no caule. A auxina reprimiu a expressão do gene *PsIPT* (TANAKA et al., 2006). Esses resultados confirmaram que as auxinas regulam os níveis de citocinina (EKLÖF et al., 1997; NORDSTROM et al., 2004). O inverso também é verdadeiro. Plantas de tabaco superprodutoras de citocinina têm menores níveis de AIA e plantas de tabaco superprodutoras de citocinina têm menores níveis (EKLÖF et al., 2000; PALNI; BURCH; HORGAN, 1988).

Efeitos da aplicação exógena dos hormônios na morfologia da planta e nas interações hormonais não são sempre reproduzíveis, devido a variações, por exemplo, na absorção e transporte. Para contornar algumas dessas limitações, plantas transgênicas superproduzindo citocinina ou auxina pela expressão ectópica dos genes de *Agrobacterium tumefaciens, ipt* ou *iaaM* e *iaaH*, respectivamente, foram estudadas (EKLÖF et al., 1996, 1997; KLEE et al., 1987; ONDREJ et al., 1991; SITBON et al., 1992; SMIGOCKI; OWENS, 1989; YUSIBOV et al., 1991). Os dados obtidos corroboram os resultados dos estudos clássicos da interação auxina-citocinina no controle do desenvolvimento das plantas.

Os níveis de citocininas ativas podem ser diminuídos através da síntese reduzida, bem como da quebra oxidativa ou conjugação. A atividade da citocinina oxidase induzida por auxina foi previamente demonstrada em explantes medulares de tabaco (PALNI; BURCH; HORGAN, 1988) onde a quebra oxidativa de zeatina ribosídeo aumentou após a adição de ANA (ácido ácido 1–naftaleno acético). Esses resultados foram sustentados pelos estudos de Zhang et al. (1995), que observaram aumento na conversão *in vitro* de zeatina para derivados de adenina após tratamento com ANA. A ação de auxinas na citocinina oxidase, entretanto, ainda tem que ser melhor verificada *in vivo*, como indicado por Motika e Kaminck (1992), que foram incapazes de demonstrar mudanças na atividade da citocinina oxidase após a aplicação de várias auxinas sintéticas na superfície de calos de tabaco.

Auxina e citocinina interagem de uma maneira complexa para controlar muitos aspectos do crescimento e diferenciação. A interação entre esses dois hormônios pode ser sinergística, antagônica ou aditiva, sugerindo uma complexa rede de interação de sinais. Além dessa complexidade, o modo de interação entre auxinas e citocininas é muitas vezes dependente da espécie e do tecido vegetal. A variedade de maneiras nas quais auxina e citocinina regulam respostas fisiológicas (por exemplo, os dois hormônios agem sinergisticamente para regular a divisão celular, e antagonisticamente para controlar o crescimento de brotos ou raízes laterais) sugere que pode haver múltiplos mecanismos de

interação (COENEN; LOMAX, 1997). Essa interação pode acontecer pela regulação tanto da homeostase quanto da percepção desses hormônios (NORDSTRÖM et al., 2004), afetando inclusive o nível de sinalização (MULLER; SHEEN, 2008).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral o estudo da interação auxina-citocinina no controle do desenvolvimento das plantas, incluindo o efeito do balanço entre essas duas classes hormonais.

De maneira mais específica, foram desenvolvidas atividades que tinham por objetivos:

- Caracterização do mutante *brt*, um possível mutante com menor sensibilidade à citocinina (Item 4);
- Obtenção de mutantes em auxina a partir de um banco de germoplasma de tomateiro e caracterização fenológica e fisiológica deles (Item 5);
- Geração de genótipos que incluem mutantes e plantas transgênicas para a criação de um modelo para o estudo da interação entre auxina e citocinina no controle do desenvolvimento (Item 6)

4. *bushy root*: UM MUTANTE DE TOMATEIRO COM DOMINÂNCIA APICAL, ÁREA FOLIAR, TAMANHO DA SEMENTE E SENSIBILIDADE À CITOCININA REDUZIDOS

Resumo

O mutante *bushy root* (*brt*) de *Solanum lycopersicum* foi introgredido no "background" Micro-Tom (MT) através de métodos convencionais de cruzamento gerando uma linhagem quase isogênica que foi nomeada de MT-*brt*. A caracterização de MT-*brt* foi realizada e foram observadas várias alterações pleiotrópicas que incluem diminuição na dominância apical, sementes muito pequenas, germinação e estiolamento do hipocótilo reduzido, folhas verde-claras e com senescência precoce, reduzida área foliar, raízes curtas e ramificadas e diferenciação celular precoce *in planta*. Esse mutante apresentou menor sensibilidade a vários tipos de citocinina. Alvos moleculares da ação da citocinina como a atividade da invertase e a expressão de um gene regulador de resposta a citocinina (o homólogo de *ARR5* de *Arabidopsis* em tomateiro) tiveram respostas alteradas em MT-*brt*. Características agronômicas ligadas ao desenvolvimento reprodutivo, como peso de frutos e sólidos solúveis totais (TSS - Brix), também apresentaram alterações significativas no mutante. O desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, a sensibilidade a citocinina e a expressão de genes, todos alterados em MT-*brt*, sugerem que essa mutação pode ser um dos alvos da ação da citocinina.

Palavras-chave: ramificação, tamanho da semente, mutante, tomateiro, citocinina

4. *bushy root*: A TOMATO MUTANT WITH REDUCED APICAL DOMINANCE, LEAF AREA, SEED SIZE AND CYTOKININ SENSITIVITY

Abstract

Here, the *bushy root* (*brt*) mutant of *Solanum lycopersicum* was introgressed into the Micro-Tom (MT) background generating a near isogenic line named MT-*brt*. It shown various pleiotropic alterations such as reduced apical dominance, very small seeds, reduced germination, reduced hypocotyl etiolation, reduced leaf area, pale green and early senescent leaves, short and branched roots and shoots and precocious *in planta* cell differentiation. Decreased sensitivity to various types of cytokinins was presented by MT-*brt*. Molecular targets of cytokinin action such as invertase activity and expression of a response regulator gene (the tomato *ARR5* homologue) induced by cytokinins were altered in MT-*brt*. Agronomic traits linked to reproductive development, such as fruit weight and total soluble solids (TSS - Brix) also showed significant alterations in MT-*brt*. The altered phenotype of MT-*brt* on reproductive and vegetative development, the altered sensitivity to cytokinins and altered gene expression suggest this mutation as target of cytokinin action.

Keywords: branching, seed size, mutant, tomato, cytokinin

4.1 Introdução

Em tomateiro, vários mutantes hormonais já foram descritos, abrangendo quase todas as classes hormonais: auxina (*dgt*, OH; IVANCHENKO; WHITE, 2005), etileno (*epi*, FUJINO et al., 1988a; *Nr*, WIKINSON et al., 1995), ácido abscísico (*not*, BURBIDGE et al., 1999; *sit*, TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000), giberelina (*gib3*, BENSEN; ZEEVAART, 1990; *pro*, BASSEL; MULLEN; BEWLEY, 2008), brassinoesteróides (*cu3*, MONTOYA et al., 2002; *dpy*, KOKA et al., 2000) e ácido jasmônico (*def1*, HOWE et al., 1996; *jai1-1*, LI et al., 2004). A disponibilidade de mutantes hormonais abre a possibilidade de se estudar o controle hormonal do desenvolvimento e as interações entre as diferentes classes hormonais nesse controle. No entanto, nenhum mutante com alterações em citocinina tinha sido descrito até o momento. Daí a importância da descoberta de um mutante para citocinina.

A mutação *brt* foi identificada em 1972 e encontra-se no cromossomo 12 de tomateiro (ZOBEL, 1972). O mutante *brt* é caracterizado pela formação de muitas raízes laterais na base do hipocótilo e o caule se desenvolve lentamente, resultando num aspecto semi-anão nos estágios iniciais do desenvolvimento. Estudos citológicos mostraram acúmulo de amido na base dessas raízes laterais e nos tecidos adjacentes do caule. Durante o alongamento das raízes o amido é hidrolisado e as raízes e o caule passam a se desenvolver mais normalmente (ZOBEL, 1972).

A mutação *brt* encontrava-se inicialmente no acesso LA2816 de *Solanum lycopersicon*, e portanto não tinha um controle com o qual pudesse ser comparado. Para contornar esse problema, essa mutação foi introgredida no background MT através de cruzamentos e retrocruzamentos (PINO-NUNES, 2005) até a geração BC₆F_n, gerando uma linhagem quase isogênica nomeada MT-*brt*. Além das alterações no tamanho e na ramificação das raízes e caules já relatadas anteriormente (ZOBEL, 1996), em comparação com o controle MT, a mutação *brt* resultou em outras alterações pleiotrópicas, como redução no tamanho das sementes, na germinação, no alongamento do hipocótilo e na área foliar, e folhas com senescência precoce e coloração verde clara. Respostas relacionadas a citocinina, como diferenciação celular (DELLO IOIO et al., 2007; MOK, 1994), atividade da invertase (ROITSCH; EHNEB, 2000; STURM; TANG, 1999) e expressão do gene regulador de resposta *LeRR5* (BRANDSTATTER; KIEBER, 1998), também foram alteradas em MT-*brt*, sugerindo uma possível relação entre citocinina e a mutação *brt*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

Uma triagem inicial para possíveis mutantes em citocinina foi conduzida nos acessos de *Solanum lycopersicum* a partir do banco de germoplasma "Tomato Genetics Research Center" (TGRC), da Universidade da Califórnia em Davis, baseada nos fenótipos descritos no "site" do TGRC (http://tgrc.ucdavis.edu/Genes.html). Sementes dos mutantes foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Chetelat da Universidade da Califórnia em Davis. Além do mutante *bushy root* (*brt*), outros mutantes foram selecionados para esse estudo, devido a suas características morfológicas: *bushy* (*bu*), *lutescent* (*l*), *green flesh* (*gf*) e *Root suppresser* (*Rs*). As sementes do parental recorrente MT foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. Levy, do Instituto de Ciências de Weizmann, Israel. Para os testes comparativos de sensibilidade, foram também utilizados os mutantes *notabilis* (*not*), *Never ripe* (*Nr*) e *diageotropica* (*dgt*), todos estes já introgredidos no "background" MT (CARVALHO, 2007).

4.2.2 Cultivo e cruzamentos

Para os mutantes que ainda não estavam no "background" MT, suas sementes, juntamente com sementes de MT, foram semeadas em vasos de 250 mL contendo uma mistura 1:1 (por volume) de substrato comercial (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e vermiculita, suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Quando o primeiro par de folhas verdadeiras foi observado, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 150 mL (para MT) ou de 10 L (parental mutante) contendo a mesma mistura de substrato. Com o progresso da introgressão, os mutantes foram adquirindo o tamanho pequeno (igual ao MT) e foram então transplantados também para vasos de 150 mL. Frutos maduros foram coletados e a polpa juntamente com as sementes foram retiradas e mantidas em fermentação com levedura comercial (Femix, Brasil) durante 1 dia. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secadas ao ar livre.

Os genótipos foram cruzados por métodos convencionais (SACKS et al., 1997). O sistema de introgressão utilizado neste trabalho está representado no Apêndice A, no qual foi utilizado como modelo o mutante *brt*. MT foi usado como receptor de pólen (parental feminino), já que ele possui marcadores recessivos (os alelos *dwarf* e *self-pruning*) que não estão presentes nos parentais dos mutantes. Em F_2 havia plantas segregantes para o tamanho

pequeno e para as mutações, cada uma de acordo com seu fenótipo específico. Essas plantas foram retrocruzadas com o parental MT até o sexto cruzamento (BC₆). A cada dois retrocruzamentos, as plantas foram autofecundadas para visualização e seleção do fenótipo mutante em homozigose. Em BC₆F₃, os genótipos resultantes da introgressão de cada mutação foram considerados como linhagens quase isogênicas (NIL, Near Isogenic Line; Reid, 1993).

A seleção do mutante *brt* nas gerações F_2 , BC_2F_2 , BC_4F_2 e BC_6F_2 foi feita baseada no fenótipo das raízes. As sementes foram germinadas em caixas do tipo gerbox, contendo papel de filtro umedecido com água destilada. Os gerbox foram mantidos em temperatura ambiente no laboratório em fotoperíodo de 16h durante 10 dias. As raízes das plântulas dos dois genótipos foram então observadas e comparadas. Plântulas de *brt* com raízes curtas e ramificadas foram selecionadas, transplantadas para a casa de vegetação e posteriormente cruzadas com MT durante o processo de introgressão. A linhagem quase isogênica de *brt* foi nomeada MT-*brt*.

4.2.3 Experimentos de dose-resposta a hormônios vegetais

Para verificar se a mutação *brt* resultava em alteração na sensibilidade hormonal, os genótipos MT e MT-*brt* foram semeados e cultivados no escuro, em caixas do tipo gerbox contendo papel de filtro umedecido com diferentes concentrações de citocinina [benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ), zeatina (Z), isopenteniladenina (iP), 0.01-100µM] e etileno (CEPA, 1-1000ppm). O ensaio de resposta à auxina em MT e nos mutantes MT-*brt* e MT-*dgt* foi conduzido *in vitro*. Explantes cotiledonares foram retirados de plântulas com 8 dias de idade (após a semeadura) germinadas e cultivadas *in vitro*. Foram realizadas 5 repetições para cada tratamento, sendo cada repetição uma placa de Petri contendo 20 explantes. Os explantes foram mantidos em meio MS suplementado com vitaminas B5, 30 g/L de sacarose, 6 g/L de ágar e 0.4 µM de ANA, durante 10 dias, a 25°C e fotoperíodo de 16h. Após esse período, foi avaliada a taxa de explantes que formaram gemas.

4.2.4 Tratamentos conduzidos em condições de luz e de escuro

Para avaliar o efeito da luz na taxa de germinação de sementes e no crescimento do hipocótilo, as sementes foram germinadas e as plântulas crescidas em condições de luz branca ou no escuro. Sementes de MT e MT-*brt* foram semeadas em caixas tipo gerbox contendo papel de filtro umedecido com água destilada. A taxa de germinação foi verificada após 5

dias, considerando a germinação como a emissão da radícula. O alongamento do hipocótilo foi mensurado pelo seu comprimento aos 10 dias de idade (após semeadura), em plântulas crescidas na luz e no escuro. Para os tratamentos em condições de luz, as plântulas foram mantidas em fotoperíodo de 16h, e não sob luz constante. Todos os tratamentos foram mantidos em B.O.D. a 25°C. Para a germinação de sementes, foram realizadas 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição um gerbox contendo 20 sementes. Para o alongamento do hipocótilo, foram realizadas 20 repetições por tratamento, sendo cada repetição uma plântula.

4.2.5 Medidas de área foliar e transpiração

A área foliar foi medida através de um planímetro eletrônico (LI-COR, Li-3000A, USA) em plantas com 85 dias de idade (a partir da semeadura), crescidas na casa de vegetação. Foram realizadas 4 repetições para cada genótipo. Os folíolos e pecíolos foram destacados e medidos separadamente para evitar a sobreposição entre eles. Os valores obidos para cada folíolo e pecíolo foram somados para obter o valor da área total da folha em cm². Para avaliar a taxa de transpiração, as folhas foram destacadas de plantas com 60 dias de idade (a partir da semeadura) e a área foliar foi medida. As folhas foram então colocadas com o pecíolo imerso em água destilada durante a noite. No dia seguinte, as folhas foram retiradas da água e colocadas em condições de luz, a 25°C. Foram feitas pesagens a cada 1 hora. A taxa de transpiração foi calculada como a razão entre a água perdida (peso inicial da folha menos o peso após 1-6 horas) e a área foliar.

4.2.6 Determinação de antocianina e clorofila

Para mensurar o acúmulo de antocianina, uma quantidade pré-definida (90 mg) de folhas ou hipocótilos inteiros foi imersa em tubos contendo metanol acidificado (50 μ L HCl / 0.5 mL MeOH) e em seguida foram incubados no escuro, sob agitação a 25°C durante 48h. Os tecidos foram removidos e 1 mL de clorofórmio foi adicionado ao tubo. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm, 5 min, 4°C) e o sobrenadante foi removido. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro em OD_{535nm}. A quantidade de clorofila foi determinada de acordo com Lichtenhalter (1987) utilizando 15 mg de folíolos e a extração foi feita "overnight" com acetona.

4.2.7 Determinação de sólidos solúveis totais (TSS)

As medidas foram feitas em frutos maduros de MT e MT-*brt* e foram expressas em graus Brix, usando um refratômetro digital (Atago PR-101, Japan). Foram realizadas 12 repetições (frutos) para cada genótipo, medindo-se o Brix de 1 fruto de cada planta.

4.2.8 Determinação da atividade da invertase

O ensaio de invertase foi realizado de acordo com protocolo descrito por Miron e Schaffer (1991), com modificações. Aproximadamente 2 g de tecidos congelados, os quais foram retirados de plântulas com 10 dias de idade (após semeadura) ou de plantas com 30 dias de idade (após semeadura), foram homogeneizados em nitrogênio líquido, em 10 mL de um tampão 100 mM de Na₂HPO₄, pH 7.5, contendo 5 mM de EDTA, 2 mM de MgCl₂, 2% de ácido ascórbico e 10 mM de 2-β-Mercaptoetanol. PVP (polivinilpirrolidona) foi adicionado durante a extração para evitar a oxidação dos tecidos.

Após a centrifugação a 18000 g durante 30 min, o sobrenadante foi colocado em colunas Sephadex G-25 equilibrado com tampão 20 mM de Na₂HPO₄. O "pellet" insolúvel foi lavado duas vezes com 10 mL de um tampão contendo 100 mM de Na₂HPO₄ e 0.8 M de NaCl, pH 7.5.

A atividade da invertase foi medida em 0.6 mL de um tampão 50 mM de citrato de fosfato, pH 4.5, contendo 0.1 mL de 1M de sacarose e 0.3 mL do extrato enzimático. Após a incubação por 60 min a 37°C, a reação foi parada em banho-maria fervente por 5 min. Os açucares redutores foram quantificados (SOMOGYI, 1945). Para o controle (branco), a enzima foi adicionada à mistura de incubação depois de 60 min.

4.2.9 Análises histológicas

Amostras do meristema apical caulinar (SAM) foram coletadas 7 dias após a germinação no escuro e raízes, limbos foliares e pecíolos maduros e totalmente expandidos foram retirados de plantas com 36 dias de idade (após semeadura) cultivadas em casa de vegetação. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), submetidas a uma bomba de vácuo para remoção do ar intercelelular, desidratadas em uma série de álcool etílico e embebidas em resina hidroxi-etil-metacrilato (Leica). As seções (5 µm de espessura), feitas

em um micrótomo rotativo (Leica) foram coradas com 0.05% de azul toluidina em um tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montadas com resina sintética Entellan (Merck).

A área das células epidérmicas foi quantificada utilizando-se a técnica de *imprints* (POOLE et al., 1996; WEYERS; JOHANSEN, 1985). Essa técnica consiste na retirada de moldes (imprints) das superfícies das folhas utilizando-se resinas Speedex Light Body e Speedex Universal Activator (Vigodent; Rio de Janeiro). Essas resinas foram misturadas, formando um polímero que é capaz de retirar uma impressão da superfície das folhas pelo contato. Para a retirada dos moldes das folhas após a polimerização, foi adicionada uma camada fina de esmalte cosmético transparente (L'Oréal; São Paulo). Essa camada de esmalte foi analisada em microscópio de luz e representa com confiança a superfície epidérmica das plantas (WEYERS; JOHANSEN, 1985). O programa ImageJ foi utilizado para a quantificação da área celular. As cores das imagens obtidas foram invertidas para facilitar a visualização.

4.2.10 Análise molecular

Plântulas de MT e MT-*brt* cresceram em meio MS com metade da concentração de macro e micronutrientes e suplementado com 2% de sacarose e 0.6% de ágar. Após 10 dias, as plântulas foram transferidas para caixas tipo gerbox contendo água ou 5 μ M de BAP. As raízes foram coletadas após 4 horas e foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

RNA total foi extraído de aproximadamente 300 mg das amostras congeladas utilizando-se TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). A qualidade do RNA foi verificada em um gel 1.5% agarose e o RNA foi quantificado em espectrofotômetro (SmartSpec 3000, BioRad, Hercules, CA), e foi então tratado com DNase I (Fermentas Life Sciences, Ontario, Canada). A primeira fita de cDNA foi sintetizada pelo sistema de transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Primers específicos para os genes alvo (LeRR5, response regulator 5) e de referência (GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foram desenhados por comparação de seqüências entre Arabidopsis, arroz e tomateiro. **ESTs** foram obtidos das bases de dados NCBI a partir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e TIGR (http://www.tigr.org/). Depois de checar as regiões conservadas de uma gene particular por alinhamento com ClustalW, os pares de primers foram desenhados usando Primer3 para amplificar os produtos de 194 e 131bp, respectivamente. Primers para o gene alvo (LeRR5, GenBank acesso TC159033: forward 5'-AGG GGT GAA GAG AAA GGA ATG e reverse 5'-CAG TGG AAT GTG TCG GTG AA)

e os transcritos de referência (*GAPDH*, GenBank acesso U93218: forward 5'-TCC ATC ACA GCC ACT CAG AA e reverse 5'-TCA ACC ACG GAC ACA TCA AC) foram sintetizados. Análises de *qRT-PCR* foram efetuadas no Rotor-Gene 3000 (Corbett, Sydney, Australia). Uma reação de PCR de 10 μ L foi preparada utilizando-se 1 μ L da primeira fita modelo de cDNA (50ng), 0.8 μ M de cada primer e 2x do "green master mix" SYBR (Applied Biosytems, UK). Todas as amostras foram amplificadas em triplicada nas seguintes condições: 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 20 s e 60°C por 45 s. Os produtos para cada conjunto de primers foram sujeitos à análise pela curva de Melt. A razão de abundância em transcritos do gene alvo para o gene de referência foi determinada conforme descrito por Pfaffl (2001).

4.2.11 Análises estatísticas

Médias e erros padrões foram estimados e, quando necessário, o teste t de Student foi realizado para a comparação entre as médias. Para TSS e produtividade, os quais são significativamente influenciados pelo ambiente, os experimentos foram repetidos em até dois perídos de cultivo diferentes em condições de casa de vegetação e os valores foram similares. Aqui foram mostrados os resultados de apenas um dos experimentos.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Respostas hormonais no mutante brt

Mutantes de tomateiro com fenótipos sugestivos de alterações hormonais foram selecionados no banco de germoplasma de Davis, "Tomato Genetics Research Center" (http://tgrc.ucdavis.edu). Cerca de 50 mutantes (incluindo mutantes já caracterizados para as principais classes hormonais) foram introgredidos no "background" MT através de retrocruzamentos sucessivos até a geração BC_6F_3 . Linhagens quase isogênicas (NILs) em um único "background" genético foram criadas (CARVALHO, 2007). Neste trabalho foram utilizados mutantes que poderiam estar relacionados com alterações na sensibilidade ou metabolismo de citocininas devido ao seu fenótipo, como *brt*, *bu*, *l*, *gf* e *Rs*. Excetuando-se *brt*, os outros mutantes selecionados não exibiram qualquer alteração na sensibilidade à citocinina (dados não mostrados) e por isso nenhuma análise adicional foi conduzida com esses genótipos.
Primeiramente a sensibilidade de MT-brt foi testada, verificando-se a inibição no alongamento da raiz em plântulas crescidas no escuro utilizando-se diferentes citocininas: thidiazuron (TDZ), BAP, zeatina e iP (10 e 100 µM). Em todas as citocininas testadas, a inibição no crescimento da raiz em 10 µM foi bem maior no MT do que em MT-brt (Figura 1A). Em 100 µM essa diferença entre os genótipos não foi tão acentuada (Figura 1B). A partir dessa verificação de que MT-brt não é totalmente insensível à citocinina, doses crescentes de TDZ (0.01-100 μ M) foram testadas. Na ausência de citocinina (controle), as raízes de MT-*brt* se desenvolveram menos do que as raízes de MT, o que já é uma característica desse mutante. Porém, o efeito de TDZ na inibição da raiz ficou evidente somente em MT (Figura 2A). Em MT-brt, a inibição no crescimento da raiz ocorreu apenas na concentração de 100 µM (Figura 2A). A inibição no crescimento da raiz é uma resposta característica de citocinina em plântulas crescidas em condições de luz (SU; HOWELL, 1992). Já em condições de escuro, citocinina pode inibir tanto o crescimento da parte aérea quanto da raiz (CARY; LIU; HOWELL, 1995). Como as plântulas de MT-brt tiveram o crescimento da raiz pouco inibido por citocinina (Figuras 1 e 2), sugere-se que esse mutante pode ser menos sensível a citocinina.

Citocininas normalmente promovem o acúmulo de antocianinas (DEIKMAN; HAMMER, 1995). Em ensaios de dose-resposta à citocinina utilizando doses crescentes de TDZ (0.1-100 μ M), os hipocótilos de plântulas MT-*brt* não apresentaram aumento no acúmulo de antocianina com o aumento da concentração de citocinina, como ocorreu em MT (Figura 2B). Embora o acúmulo de antocianinas em resposta a citocinina seja um efeito específico para essa classe hormonal, o mesmo não acontece para a inibição no crescimento da raiz, que poderia ser mediado por outros hormônios, como etileno, auxina e ácido abscísico (CARY; LIU; HOWELL, 1995; PILET; SAUGY, 1987).

Para testar a resposta de MT-*brt* ao etileno, uma curva de dose-resposta foi realizada utilizando-se MT, MT-*brt* e MT-*Nr*. A mutação *Never ripe* (*Nr*) leva à insensibilidade ao etileno devido a alterações em seu receptor (WIKINSON et al., 1995). Um efeito clássico de etileno em plântulas de tomateiro crescidas no escuro inclui inibição e engrossamento dos hipocótilos, aumento do gancho plumular e inibição no crescimento da raiz (LANAHAN et al., 1994). Raízes de MT-*Nr* foram inibidas somente por altas concentrações de etileno (acima de 100 ppm), enquanto a inibição em MT e MT-*brt* foi proporcional à concentração de CEPA (Figura 3A). A curva de dose-resposta de MT-*brt* também sugere uma sensibilidade levemente menor ao etileno quando comparado a MT, mas isso está longe de ser comparável a MT-*Nr* (Figura 4G). Além disso, frutos de MT-*Nr* demoram muito mais para amadurecer e

nunca desenvolvem a cor vermelha (LANAHAN et al., 1994), enquanto frutos de MT-*brt* amadurecem normalmente, como ocorre em MT (Figura 4A). Assim, a possibilidade de *brt* ser uma mutação primária em etileno pode ser descartada, porém uma interação entre a baixa sensibilidade à citocinina e ao etileno é possível, como sugerido previamente (HASS et al., 2004; MASON et al., 2005).

Para avaliar o efeito de ABA no mutante MT-*brt*, uma comparação com o mutante deficiente em ABA, MT-*not*, foi realizada. A mutação *notabilis* (*not*) leva a um aspecto murcho da planta devido à deficiente biossíntese de ABA (BURBIDGE et al., 1999). A taxa de transpiração foi verificada em plantas MT, MT-*brt* e MT-*not*. No presente ensaio, a resposta à deficiência ou insensibilidade ao ABA seria similar (KOORNNEEF et al., 1982; KOORNNEEF; REULING; KARSSEN, 1984). A taxa de transpiração (perda de água) foi maior em MT-*not*, enquanto MT-*brt* apresentou taxa de transpiração semelhante a do controle MT (Figura 3B), excluindo-se então a possibilidade de *brt* ser uma mutação primária que afeta a sensibilidade ao ABA.

Quanto à auxina, foram comparados os genótipos MT, MT-*brt* e MT-*dgt* num ensaio de indução de formação de raízes em explantes cotiledonares. Após 10 dias, foi avaliada a taxa de explantes que formaram raízes adventícias. O mutante MT-*dgt* é pouco sensível à auxina (OH; IVANCHENKO; WHITE, 2005) e, dessa forma, a indução na formação de raízes foi comprometida (Figura 3C). Em MT e MT-*brt*, a taxa de explantes com raízes foi de 93 e 98%, respectivamente (Figura 3C), evidenciando que a mutação *brt* não afeta a sensibilidade à auxina.



Figura 1. Crescimento da raiz primária em plântulas de MT e MT-*brt* germinadas e crescidas em gerbox com papel de filtro umedecido com soluções de diferentes citocininas em concentrações de 10 μ M (A) e 100 μ M (B), no escuro. Os dados são apresentados em porcentagem do controle (sem hormônio), 15 dias após semeadura (n=15).



Figura 2. Inibição no crescimento da raiz primária e acúmulo de antocianinas em plântulas com 10 dias de idade (após semeadura), germinadas e crescidas no escuro. (A) plântulas de MT e MT-*brt* crescidas em diferentes doses de citocinina (0.01-100 μ M TDZ). (B) Acúmulo de antocianina no hipocótilo de plântulas de MT e MT-*brt* em resposta à citocinina (0.1-100 μ M TDZ).



Figura 3. Resposta de MT, MT-brt e mutantes específicos em etileno (MT-Nr), ABA (MT-not) e auxina (MT-dgt). (A) Plântulas de MT, MT-Nr e MT-brt foram crescidas em diferentes doses de CEPA (1-1000 ppm). (B) Taxa de transpiração verificada em plantas MT, MT-not e MT-brt. A transpiração foi medida como perda de água (mg/cm²) em intervalos de uma hora durante 6 horas. (C) Formação de raízes em explantes cotiledonares cultivados em meio MS suplementado com 0.4 μM de ANA. Barras de erro representam SE; n=15 em A e n=5 em B e C.

4.3.2 Caracterização fenotípica de MT-brt

O fenótipo de MT-brt já é distinguível no estágio inicial do desenvolvimento, mostrando redução na germinação de sementes em condições de luz e escuro e no comprimento do hipocótilo e das raízes em condições de escuro (Tabela 1). Raízes de MT se desenvolveram mais em condições de luz do que de escuro, um efeito não observado em raízes de MT-brt. Essa redução na germinação de sementes em condições de luz e escuro pode ser contabilizada pelo baixo acúmulo de reservas na semente, como sugerido pelo tamanho consideravelmente menor nas sementes de MT-brt (Figura 4B). Porém plântulas MT-brt crescidas na luz apresentaram raízes mais ramificadas do que MT (Tabela 1). Duplos mutantes de Arabidopsis, especialmente ahk2 ahk3, com perda de função nos receptores de citocinina, também apresentaram raízes mais ramificadas (RIEFLER et al., 2006). Como os hipocótilos de MT e MT-brt apresentaram praticamente o mesmo comprimento em condições de luz (Tabela 1), a ligeira redução no comprimento do hipocótilo de plântulas MT-brt crescidas no escuro, quando comparado com MT, indica que esse mutante tem respostas de estiolamento prejudicadas devido a alguma alteração nas respostas de fotomorfogênese. Mutantes e plantas transgênicas com alterações nos níveis endógenos ou sensibilidade a citocinina também apresentaram alterações na fotomorfogênese (CHORY et al., 1994; RIEFLER et al., 2006).

Plantas adultas de MT-*brt* crescidas em casa de vegetação apresentaram altura reduzida (Figura 4A), baixo acúmulo de matéria seca tanto na parte aérea quanto nas raízes, folhas verde-claras e menor área foliar (Tabela 1). Tem sido sugerido que a redução na área foliar em plantas deficientes em citocinina acontece no início da formação da folha devido a restrições na divisão celular (WERNER et al., 2003).

O fenótipo "pálido" de MT-*brt* é causado pelo menor conteúdo de clorofila em relação a MT (Tabela 1). A sensibilidade à citocinina diminuída é, provavelmente, a causa dessa diminuição no conteúdo de clorofila nas folhas, já que as citocininas estão envolvidas na diferenciação de cloroplastos (MOK; MOK, 2001). Mutantes no receptor de citocinina (RIEFLER et al., 2006) e plantas transgênicas com menores níveis endógenos de citocinina (WERNER et al., 2003) em *Arabidopsis* também apresentaram menor conteúdo de clorofila. Enquanto a característica mais notável de MT-*brt* é o fenótipo ramificado das raízes (Figura 4F), a parte aérea desse mutante também desenvolveu um hábito de crescimento bastante ramificado (diminuição na dominância apical), o qual foi particularmente notável quando comparado com o fenótipo de MT (Figura 4D). Essa diminuição na dominância apical foi um resultado curioso para MT-*brt*. Esse fenótipo é característico de plantas superprodutoras de citocinina (CATTEROU et al., 2002; CHAUDHURY et al., 1993; RUPP et al., 1999). Entretanto, o mesmo resultado foi observado em plantas deficientes (WERNER et al., 2003) e insensíveis (RIEFLER et al., 2006) a citocinina em *Arabidopsis*. A dominância apical é um reflexo da formação de um dreno preferencial (PERES et al., 2005), o qual poderia ser induzido por citocininas (ROITSCH; EHNEB, 2000). O efeito final da citocinina na indução caulinar e no crescimento é, em parte, dependente de gradientes no corpo da planta (ESTRUCH et al., 1991). Assim, a redução na dominância apical de MT-*brt* ou em plantas superexpressando a enzima *CKX (citocinina oxidase)* pode ser explicada com a mesma observação feita para mutantes ou plantas transgênicas superprodutores de citocinina, já que em todos esses casos o efeito comum seria a falta de um gradiente hormonal apropriado e a ausência de um dreno dominante. Levando-se isso em conta, podemos esperar que o efeito das citocininas no desenvolvimento das plantas seja mais comparável a um reostato (gradiente) do que a um "interruptor", como previamente sugerido (RUPP et al., 1999).

O número de folhas na antese foi menor em MT-*brt* (Tabela 1), sugerindo precocidade reprodutiva ou uma redução na "população" de células meristemáticas necessárias para a formação contínua das folhas. Isso é consistente com a existência de um "feedback" positivo entre os genes *KNOX* e citocininas (RUPP et al., 1999), onde as células matrizes são necessárias para manter a população de células meristemáticas indiferenciadas no ápice caulinar (LENHARD; JÜRGENS; LAUX, 2002), levando a uma perpetuação do caule e à formação das folhas. Apesar da aparente precocidade reprodutiva, o tempo para a antese em 50% das plantas foi significativamente maior para MT-*brt* (Tabela 1), o qual está bem correlacionado com o aspecto pouco desenvolvido desse genótipo (Figura 4E). O número de flores por inflorescência em MT e MT-*brt* foi praticamente o mesmo (i.e. 7-8 flores) e a única alteração considerável nas flores de MT-*brt* foi a redução no comprimento das sépalas (Figura 4C), semelhantemente à redução na área foliar (Figura 4E, Tabela 1).

Nenhuma diferença óbvia foi observada no aspecto dos frutos maduros de MT-*brt* (Figura 4A). Entretanto, o período necessário para o completo amadurecimento dos frutos desde a antese foi maior nos frutos de MT-*brt* (Tabela 1). Esses resultados também sugerem que a mutação *brt* pode estar relacionada com citocinina, além de uma possível redução na sensibilidade ao etileno, onde doses acima de 10 ppm de CEPA são necessárias para inibir o crescimento da raiz primária no mutante enquanto em MT essa inibição ocorre já em doses menores de CEPA (Figura 3A). O peso médio dos frutos foi menor em MT-*brt* (Tabela 1). O crescimento dos frutos de tomateiro é dependente tanto da divisão quanto da expansão celular

(GIOVANNONI, 2004), o que implica que qualquer alteração no metabolismo e/ou percepção à auxina ou citocinina, que são hormônios relacionados com esses processos, tem impacto no tamanho do fruto. Frutos de tomateiro com pouca sensibilidade a auxina devido à mutação *diageotropica* (*dgt*) têm peso reduzido (BALBI; LOMAX, 2003). O isolamento e seqüenciamento de *FW2.2*, um locus que é responsável por 20-30% do peso do fruto de tomateiro, mostrou que esse gene controla a divisão celular (FRARY et al., 2000). Frutos de MT-*brt* eram 30% menores, apesar do peso total dos frutos na planta não diferir de MT (Tabela 1). Isso está de acordo com a observação de que o número total de frutos foi 30% maior em MT-*brt* (Tabela 1), o que poderia ser meramente uma conseqüência do hábito de crescimento ramificado no mutante (Figura 4D). Em outras palavras, o menor tamanho dos frutos no mutante foi compensado pelo maior número de frutos, levando a produções semelhantes entre MT-*brt* e MT. O número de lóculos foi medido nos dois genótipos e para ambos, a maior parte dos frutos apresentou 3 lóculos (dados não mostrados).

O teor de sólidos solúveis totais (TSS) dos frutos foi cerca de 20% maior em MT-brt do que em MT (Tabela 1). TSS é um parâmetro de grande importância em tomate processado (SCHAFFER et al., 1999). Considerando que a mutação brt poderia estar relacionada à redução na sensibilidade a citocinina, esse seria um resultado inesperado, já que citocininas parecem ser necessárias para promover a formação de drenos (ROITSCH; EHNEB, 2000), e assim o acúmulo de fotoassimilados que contribuem para o brix. Dessa forma, plantas transgênicas de tomateiro expressando o gene ipt especificamente em tecidos do ovário tiveram um aumento no brix dos frutos, embora tenham apresentado concomitantemente uma diminuição na produção (MARTINEAU et al., 1995). Considerando que o peso total dos frutos de MT-brt não diferiu de MT, conforme já discutido anteriormente, pode-se sugerir que a elevação no brix em MT-brt ocorre sem que haja prejuízo na produção. O principal alvo da citocinina na indução de drenos apoplásticos é a invertase de parede celular (ou invertase extracelular, LARA et al., 2004; ROITSCH; EHNEB, 2000), a qual mostrou atividade reduzida em MT-brt (item 2.3.4), tornando difícil entender como esse genótipo poderia manter um elevado brix. O tamanho reduzido das sementes em MT-brt (Figuras 4B e 5B) poderia ser a chave para esse aparente conflito. Sementes são drenos apoplásticos (PATRICK, 1997). Por isso, a atividade da invertase de parede celular é o fator principal controlando o tamanho desse órgão (WOBUS; WEBER, 1999). Assim, pode ser esperado que uma redução no descarregamento apoplástico (mediado pela invertase de parede celular) afetaria as sementes num nível mais amplo do que os ovários, onde o descarregamento pode ser tanto apoplástico como simplástico (PATRICK, 1997). Se isso for verdadeiro, qualquer redução no

tamanho da semente poderia ter um grande impacto no brix, simplesmente por favorecer os tecidos do ovário na competição com as sementes por fotoassimilados. É notável que todas as espécies selvagens de *Solanum* próximas ao tomateiro apresentam altos níveis de brix e tamanho da semente reduzido (TAYLOR, 1986). Por outro lado, um efeito oposto (sementes grandes) foi observado em plantas transgênicas superexpressando CKX (WERNER et al., 2003) e em mutantes no receptor de citocinina (RIEFLER et al., 2006) em *Arabidopsis*.

Para uma melhor compreensão da relação entre citocinina e o tamanho da semente, foram pesadas amostras de 100 sementes para cada genótipo: o peso das sementes de MT-*brt* foi aproximadamente 25% do peso das sementes de MT (Figura 5B). Além disso, os embriões foram retirados de sementes desses genótipos e foi observado que o tamanho do embrião de MT é consideravelmente maior que MT-*brt* (Figura 5A). Para verificar se o tamanho da semente também é influenciado pelo tecido materno, sementes de MT, MT-*brt* e sementes F1 do cruzamento recíproco entre MT e MT-*brt* foram pesadas. Quando o MT foi utilizado como receptor de pólen (e MT-*brt* como doador), as sementes F1 ficaram maiores até do que as sementes de MT, e quando o MT-*brt* foi utilizado como receptor de pólen (e MT como doador) as sementes se desenvolveram bem menos (Figura 5B). Como a mutação *brt* é recessiva, nas sementes F1, os dois tipos de embriões (MT x MT-*brt* e MT-*brt* x MT) são iguais (heterozigotos). O que difere nessas sementes é apenas o tecido materno (endosperma). Esses resultados indicam que o tecido materno também tem um forte efeito sobre o tamanho das sementes.

Características	MT	MT-brt
Plântulas crescidas no escuro ¹		
Germinação de sementes (%)	93.3±3.3	63.3±7.05
Comprimento do hipocótilo (mm)	43.05±1.10	38.35±1.08
Comprimento da raiz (mm)	86.93±3.09	33.2±1.12
Plântulas crescidas na luz ¹		
Germinação de sementes (%)	78.6±2.40	68±7.57
Comprimento do hipocótilo (mm)	20.8±0.29	19.85±0.25
Comprimento da raiz (mm)	139.1±4.04	32±0.83
Número de raízes laterais ²	0.5±0.12	1.36±0.20
Plantas crescidas na casa de vegetação		
Altura (mm) – 14 dias	27	19.2
Matéria seca da parte aérea (mg) ³	393.3±0.06	243.3±0.01
Matéria seca das raízes (mg) ³	117±0.02	37±0.01
Área da célular (mm 2 10 $^{-3}$)	62.13±6.31	38.68±1.59
Área foliar $(cm^2)^4$	36.23±1.26	18.43±0.85
Coloração das folhas	Verde	Verde-clara
Teor de clorofila nas folhas $(mg g^{-1} FW)^4$	2.49±0.01	1.38±0.16
Dominância apical	Normal	Diminuída
Número de folhas na antese	10±1,15	7,67±0,33
Dias para a antese (em 50% das plantas)	38	44
Dias para amadurecimento do fruto (desde a antese)	47.78±1.76	52.21±1.07
Peso do fruto maduro (g)	6.5±0.54	4.5±0.49
Peso total dos frutos (g) por planta ⁵	43.4±1.9	41.9±3.4
Número total de frutos por planta ⁵	7.87±0.49	10.75±0.57
TSS (Brix)	4.46 ± 0.05	5.46±0.21
Número de sementes por fruto	41.3±5.49	33.3±2.65

Tabela 1 – Comparação de características fenotípicas entre Micro-Tom (MT) e MT-brt.

¹plântulas com 10 dias de idade (após semeadura); ²não houve formação de raízes laterais em plântulas crescidas no escuro; ³plantas com 45 dias de idade (após semeadura); ⁴área da 4ª folha, totalmente expandida; ⁵Plantas crescidas em vasos de 150 mL; TSS, Sólidos Solúveis Totais, n=12 frutos.



Figura 4. Fenótipo de MT-*brt* comparado ao MT. (A,D,F) Ramificação na parte aérea (A,D) e nas raízes (F). As folhas do caule foram retiradas para facilitar a visualização da ramificação (D). (B,C) Tamanho das sementes (B) e flores (C). (E) Desenvolvimento vegetativo em plantas crescidas em casa de vegetação, aos 30 dias de idade (após semeadura). (G) Plântulas de MT, MT-*brt* e MT-*Nr* (mutante insensível ao etileno) germinadas e crescidas em papel de filtro umedecido com água (0) e com solução de 50 ppm de CEPA para comparar o efeito do etileno na inibição do desenvolvimento da raiz primária. Barras = 10 mm em B, 25 mm em C e 30 mm em G; Régua = 15 cm em A e E.



Figura 5. Efeito da mutação *brt* e do tecido materno no desenvolvimento do embrião (A) e da semente (B). (A) As sementes foram mantidas em papel de filtro umedecido com água destilada durante 24 h e a casca foi removida, barra = 1mm. (B) O cruzamento foi realizado entre MT e MT-*brt*. Os "parentais" foram comparados com as 2 gerações F₁, onde o primeiro genótipo do cruzamento foi usado como receptor de pólen e o segundo genótipo como doador de pólen.

4.3.3 A mutação brt afeta divisão e diferenciação celular

As células de epiderme foliar de MT-*brt* apresentaram-se menores do que em MT (Figura 6A-B), o que pôde ser confirmado pela área dessas células (Tabela 1). O maior alogamento celular nas células dos parênquimas paliçádico e esponjoso levaram a um aumento na espessura do limbo foliar de MT-*brt* em relação a MT (Figura 6E-F). As raízes de MT-*brt* também apresentaram tecidos vasculares mais diferenciados (Figura 6D), particularmente elementos traqueais, células corticais alongadas, bem como um número reduzido de camadas celulares no cortex: 4 em MT-*brt* e 6 em MT (Figura 6C-D). Similarmente, as células corticais da face adaxial do pecíolo de MT-*brt* mostraram maior diâmetro e menor número de camadas celulares, sendo 5 em MT-*brt* e 8 em MT (Figura 6G-H). Werner et al. (2003) observaram redução no tamanho do meristema apical caulinar em plantas de *Arabidopsis* deficientes em citocininas, e sugeriram que citocininas, não apenas controlam a taxa de proliferação celular, mas também estão envolvidas na regulação da

transição de células meristemáticas indiferenciadas para primórdios diferenciados. O menor número de camadas celulares no córtex da raiz e do pecíolo do mutante MT-*brt* seria então explicado pela menor proliferação celular que ocorre nessa região devido à menor sensibilidade à citocinina. Por outro lado, como citocininas estimulam a diferenciação celular, era de se esperar que o mutante MT-*brt*, por ser menos sensível à citocinina, teria diferenciação atrasada. No entanto, os resultados sugerem diferenciação celular precoce no mutante, em relação ao MT (Figura 6).

4.3.4 A mutação brt afeta alvos moleculares da ação da citocinina

O gene regulador de resposta do tipo A, *ARR5 (Arabidopsis Response Regulator 5)*, é rapidamente e especificamente induzido por citocininas (BRANDSTATTER; KIEBER, 1998) ao nível transcricional (IMAMURA et al., 1999; TANIGUCHI et al., 1998). A expressão do gene de resposta primária a citocinina, *LeRR5* de tomateiro, foi analizado usando RT-PCR quantitativo em folhas e raízes de MT e MT-*brt*. A expressão foi 59% e 117% maior nas raízes do que nas folhas, respectivamente, em MT e MT-*brt* (dados não mostrados), como mostrado previamente por D'Agostino, Deruère e Kieber (2000) em *Arabidopsis*. Dessa forma, a expressão de *LeRR5* foi verificada em raízes de plântulas com 10 dias de idade (após semeadura). As plântulas foram mantidas durante 4 horas numa solução contendo BAP e em seguida as raízes foram coletadas para a análise. Os níveis de RNA de *LeRR5*, determinados via RT-PCR quantitativo, indicaram uma expressão cerca de quatro vezes menor em *MT-brt* tanto em água quanto no tratamento com BAP, em comparação a MT (Figura 7A).

A atividade ácida da invertase também é induzida por citocininas (ROITSCH; EHNEB, 2000; STURM; TANG, 1999). Consistentemente, o mutante MT-*brt* apresentou atividade reduzida das invertases vacuolar e de parede, tanto em plântulas quanto em plantas (Figura 7B), prejudicando o descarregamento do floema nos drenos apoplásticos (PATRICK, 1997), como por exemplo sementes. Acredita-se que essas enzimas mediam o efeito da citocinina no desenvolvimento de drenos (ROITSCH; EHNEB, 2000) e também na inibição da senescência (LARA et al., 2004). Além disso, a invertase vacuolar, que é considerada importante para a expansão celular através da redução no potencial de água da célula (STURM; TANG, 1999), teve sua atividade reduzida em MT-*brt* (Figura 7B) e, dessa forma, a função das citocininas na expansão celular não pode ser excluída.



Figura 6. Histologia do meristema apical caulinar (SAM), raízes, limbo foliar e pecíolo de MT (A,C,E,G) e MT-*brt* mutant (B,D,F,H). (A,B) Seção longitudinal de células epidérmicas. (C,D) Seção transversal da raiz primária a 5 mm do ápice. (E,F) Seção transversal de limbos foliares completamente desenvolvidos. (G,H) Seção transversal do pecíolo a 5 mm da base. O material utilizado para análise das células epidérmicas (A,B) e das raízes primárias (C,D) foi extraído de plântulas com 7 dias de idade (após semeadura) crescidas no escuro. As análises de limbo foliar (E,F) e pecíolos (G,H) foram feitas em materiais vindos de plantas com 36 dias de idade (após semeadura) cultivadas em casa de vegetação. Barra = 50 μm em C-F e 100 μm em A, B, G e H. Legenda: E, endoderme; P, primórdio foliar; Pe, periciclo; Ph, floema; Sp, parênquima lacunoso; Pp, parênquima paliçádico; X, xilema.



Figura 7. Respostas específicas de citocinina em MT e MT-*brt*. (A) RT-PCR Quantitativo de LeRR5, um homólogo do gene regulador de resposta de Arabidopsis ARR5, em tomateiro. (B) Atividade ácida da invertase em MT e MT-brt.

4.4 Conclusões

Os resultados deste trabalho sugerem que a mutação *brt* de tomateiro leva a uma diminuição na sensibilidade a citocinina sendo, porém, um alvo secundário da ação dessa classe hormonal. A análise de MT-*brt* revelou uma importante função da citocinina na formação da semente e na determinação da dominância apical em tomateiro. Além disso, vários traços regulados por citocinina são de importância agronômica, como TSS, o qual é alterado positivamente no mutante.

5. ANÁLISES DE RESPOSTA À AUXINA NOS MUTANTES DE TOMATEIRO entire E potato leaf

Resumo

Auxinas controlam muitas respostas de desenvolvimento incluindo indução de raízes, pegamento do fruto e arquitetura foliar. Neste trabalho, foi verificado se os mutantes de tomateiro (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom) em arquitetura foliar entire (e), um possível Aux/IAA, e *potato leaf* (*c*), uma proteína da família MYB, apresentavam alteração em outras respostas de auxina. O mutante c não diferiu de Micro-Tom (MT) nos ensaios realizados. Entretanto, o mutante e apresentou alto nível de partenocarpia em ovários não polinizados, quando comparado a MT. Esse mutante também teve elevada formação de raízes induzida por ANA em explantes cotiledonares. A indução de raiz foi suprimida no mutante insensível à auxina diageotropica (dgt), mas o duplo mutante dgt e mostrou uma resposta intermediária (aditiva). O alongamento de segmentos de hipocótilo, em conseqüência de AIA exógeno, não mostrou diferenças ao comparar MT e e, mas ambos dgt e o duplo mutante dgt e foram insensíveis à auxina. O duplo mutante dgt e também mostrou a mesma resposta agravitrópica no caule mostrada por dgt após 5 h de observação. Nossos resultados indicam que a mutação e pode aumentar a sensibilidade à auxina em alguns órgãos (i.e. ovários e cotilédones) a as análises do duplo mutante sugerem que E tem uma pequena participação, se houver, nos processos controlados por DGT (i.e. alongamento do hipocótilo e gravitropismo). As análises do duplo mutante também indicaram que E e DGT agem em vias diferentes no controle da indução de raízes.

Palavras-chave: auxina, sensibilidade, Micro-Tom, arquitetura foliar

5. AUXIN RESPONSE ASSAYS IN entire AND potato leaf TOMATO MUTANTS

Abstract

Auxin controls many developmental responses such as root induction, fruit set and leaf architecture. Here we tested whether the tomato (cv Micro-Tom) leaf-architecture mutants *entire* (*e*), a putative Aux/IAA, and *potato leaf* (*c*), a MYB protein, were altered in other auxin responses. The mutant *c* did not differ from Micro-Tom (MT) in any auxin response tested. However, *e* presented a high parthenocarpy in unpollinated ovaries, compared to MT. The *e* mutant also had a higher NAA-induced root formation in cotyledons, compared to MT. Root induction was suppressed in the auxin-insensitive *diageotropica* (*dgt*) mutant, but the double *dgt e* showed an intermediary (additive) response. The hypocotyls elongation, upon exogenous IAA, showed no differences comparing MT and *e*, but both *dgt* and *dgt e* were auxin-insensitive. The double mutant *dgt e* also showed the same agravitropic response of *dgt* shoots after 5 h of observation. Our results indicate that *e* may increase auxin sensitivity in some organs (e.g. ovaries and cotyledons) and the double mutant analysis suggests that *E* has a little participation, if any, in processes controlled by *DGT* (e.g. hypocotyl elongation and gravitropism). Double mutants also indicated that *E* and *DGT* act in different pathways controlling root induction.

Keywords: auxin, sensitivity, Micro-Tom, leaf architecture

5.1 Introdução

Auxinas são moléculas com uma poderosa habilidade de induzir respostas de crescimento nas plantas. Nestas, o crescimento é definido como um aumento irreversível de tamanho, o qual acontece através da expansão de células individuais via absorção de água (EVANS, 1985). Auxinas são enquadradas como uma classe importante de hormônios vegetais que está relacionada com a maioria das mudanças de crescimento que ocorre durante o ciclo de vida da planta (TEALE; PAPONOV; PALME, 2006).

Várias respostas de desenvolvimento são controladas por auxinas. Ao nível celular, elas controlam divisão, expansão e diferenciação celular. Na planta como um todo, auxinas têm função essencial em processos como dominância apical, formação de raízes laterais/adventícias, tropismos, pegamento e desenvolvimento do fruto, diferenciação vascular e embriogênese (FRIML, 2003).

Essas respostas à auxina são mediadas por 2 grupos de genes já bastante estudados: os genes Aux/IAA, que são constituídos por 29 membros, e os genes ARFs (Auxin Response Factor), com 23 membros em Arabidopsis (REMINGTON et al., 2004). A família gênica Aux/IAA forma um grupo de genes de resposta inicial à auxina. A variação na identidade dos aminoácidos entre esses genes é elevada, de 10% a 83%. Entretanto, apesar de serem membros de uma família pobremente conservada, eles parecem ter funções compensatórias. Em outras palavras, apesar de apresentarem respostas distintas quanto à cinética de indução, dose-resposta e perfil de expressão, é difícil obter informação funcional conclusiva para os genes Aux/IAA usando mutantes de perda de função (OVERVOORDE et al., 2005). Cada gene Aux/IAA pode ter uma série de funções não essenciais, mas essas funções se combinam para formar um importante programa regulatório. Os genes Aux/IAA são expressos em padrões espacial e temporal distintos, contribuindo para a diversidade de respostas de auxina em diferentes tecidos, órgãos e estágios de desenvolvimento da planta (ABEL; NGUYEN; THEOLOGIS, 1995). Os genes ARFs são ativadores e repressores transcricionais que contêm um domínio amino-terminal, e se ligam a elementos de resposta à auxina (ARE, Auxin-Responsive Element) encontrados em promotores de genes de resposta primária/inicial à auxina, incluindo os próprios membros da família Aux/IAA (ULMASOV et al., 1997).

Além das respostas controladas por auxina já citadas, ela é necessária também para a formação da folha desde os estágios iniciais do desenvolvimento, e isso pode ser verificado tanto em plantas com folhas simples como em plantas com folhas compostas, através da expressão do gene PIN1, um transportador de efluxo de auxina. Esse tipo de transporte de

auxina pode influenciar o momento e a direção do crescimento celular para produzir formas distintas de folhas (HAY; BARKOULAS; TSIANTIS, 2006). Além disso, a formação de folíolos e de outras modificações na margem da folha ocorre em resposta à expressão ectópica dos genes KNOX (CHUCK; LINCOLN; HAKE, 1996; HAY; BARKOULAS; TSIANTIS, 2006). Folhas simples e folhas compostas são resultantes de padrões de atividade meristemática diferenciados (HAREVEN et al., 1996). Tomateiro é uma planta bem adaptada para estudar a complexa morfogênese foliar, já que um grande número de mutantes foliares, desde folhas simples até folhas supercompostas, está disponível (STEVENS; RICK, 1986).

Neste trabalho foram explorados os mutantes *diageotropica* (*dgt*), *entire* (*e*) e *potato leaf* (*c*) de *Solanum lycopersicum* para verificar se o padrão de respostas à auxina é alterado nesses mutantes. O mutante *dgt* é caracterizado por uma grande quantidade de defeitos fisiológicos e de desenvolvimento, que o determina como um mutante pouco sensível à auxina (KELLY; BRADFORD, 1986; LOMAX et al., 1993; MUDAY; LOMAX; RAYLE, 1995). Partindo desse mutante já caracterizado e dos mutantes *e* e *c*, duplos mutantes foram obtidos no "background" Micro-Tom (MT) para analisar respostas de auxina. Parâmetros como forma da folha (índice de recorte), desenvolvimento das raízes em plântulas, área foliar, organogênese, curva de dose-resposta, partenocarpia e gravitropismo foram verificados.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material vegetal, cultivo e cruzamentos

Plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) foram usadas nos experimentos. As sementes de Micro-Tom (MT) foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. Levy, do Instituto de Ciências de Weizmann, Israel e as sementes dos mutantes *diageotropica* (*dgt*), *potato leaf* (*c*) e *entire* (*e*) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Chetelat da Universidade da Califórnia em Davis.

O mutante dgt já havia sido obtido no "background" MT (CARVALHO, 2007) e os mutantes c e e foram introgredidos no "background" MT por métodos convencionais (SACKS et al., 1997). MT foi usado como receptor de pólen (parental feminino), já que ele possui marcadores recessivos (os alelos *dwarf* e *self-pruning*) que não estavam presentes nos parentais dos mutantes. Em F₂ havia plantas segregantes para o tamanho pequeno e para as mutações c e e, cada uma de acordo com seu fenótipo específico. Para e, foram selecionadas plântulas com folhas simples e parcialmente enrugadas e para c foram selecionadas plântulas com folhas semi-compostas. Essas plantas foram retrocruzadas com o parental MT até o sexto cruzamento (BC₆). A cada dois retrocruzamentos, as plantas foram autofecundadas para visualização e seleção do fenótipo mutante em homozigose. Em BC₆F₃, os genótipos resultantes da introgressão de cada mutação foram considerados como linhagens quase isogênicas (NIL, Near Isogenic Line; REID, 1993).

Para os mutantes c e e, que ainda não estavam no "background" MT, suas sementes, juntamente com sementes de MT, foram semeadas em vasos de 250 mL contendo uma mistura 1:1 (por volume) de substrato comercial (Plantmax HT Eucatex, Brasil) e vermiculita, suplementada com 1 g/L de NPK 10:10:10 e 4 g/L de calcário. Quando o primeiro par de folhas verdadeiras foi observado, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 150 mL (para MT) ou de 10 L (parental mutante) contendo a mesma mistura de substrato. Com o progresso da introgressão, os mutantes foram adquirindo o tamanho pequeno (igual ao MT) e foram então transplantados também para vasos de 150 mL. Frutos maduros foram coletados e a polpa juntamente com as sementes foram retiradas e mantidas em fermentação com levedura comercial (Femix, Brasil) durante 1 dia. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente e secadas ao ar livre.

5.2.2 Obtenção de duplos mutantes

Partindo-se de todas as mutações num mesmo "background" genético (MT), foram obtidos os duplos mutantes *c dgt* e *dgt e*. Para obtenção do duplo mutante *dgt e*, *dgt* foi usado como receptor e *e* como doador de pólen. As plantas originadas desse cruzamento (F_1) foram autofecundadas, gerando sementes F_2 , as quais foram semeadas em bandeja. Em F_2 , surgiram plantas com fenótipo normal (plantas heterozigotas para as duas mutações, 9:16), plantas com fenótipo *dgt* (3:16), plantas com fenótipo *e* (3:16) e, em menor proporção (1:16), plantas com fenótipo intermediário entre as mutações (duplo mutante *dgt e*), apresentando folhas hiponásticas (como *dgt*) e pseudo-simples (como *e*).

Para obtenção do duplo mutante $c \, dgt$, utilizou-se o mesmo procedimento usado na obtenção do duplo mutante $dgt \, e$. Em F₂, surgiram plantas com fenótipo normal, plantas com fenótipo dgt, plantas com fenótipo c e plantas com fenótipo intermediário entre as duas mutações (duplo mutante $c \, dgt$), apresentando folhas hiponásticas (como dgt) e semicompostas (como c), nas mesmas proporções obtidas para o duplo mutante $dgt \, e$.

5.2.3. Padrão de desenvolvimento das plantas

Para verificar o padrão de desenvolvimento da parte aérea, as plantas foram crescidas em casa de vegetação e fotografadas no momento da antese, para observação do aspecto morfológico de folhas totalmente expandidas, a espessura de caules e pecíolos e o aspecto visual da planta como um todo. Para estudar o padrão de crescimento, as plantas foram cultivadas em casa de vegetação e medidas semanalmente a partir do transplantio, com auxílio de uma régua, até os 39 dias (6 semanas).

5.2.4 Medidas de perímetro, área foliar e índice de recorte da folha

Para mensurar perímetro, área foliar e índice de recorte, folhas completamente expandidas foram retiradas de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação e foram digitalizadas (Scanner HP Scanjet 2400) com resolução de 100 dpi. As imagens geradas foram analisadas pelo programa Quant (Quant v.1.0.1) para mensurar a área foliar e o perímetro. A partir desses dados, o índice de recorte das folhas foi obtido dividindo-se o perímetro da folha pela sua área.

5.2.5 Curvas de dose-resposta à auxina

Para verificar a sensibilidade dos mutantes à auxina, dois experimentos de doseresposta foram realizados: formação de raízes em explantes cotiledonares e alongamento de segmentos de hipocótilo em doses crescentes de ANA (ácido α –naftaleno acético, uma auxina sintética) e AIA (ácido indol-3-acético, uma auxina natural), respectivamente.

Para o experimento de formação de raízes, plântulas foram germinadas e crescidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais, metade da concentração de vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), 15 g/L de sacarose e 2.3 g/L de phytagel, durante 4 dias no escuro seguidos por incubação por mais 4 dias em sala com fotoperíodo de 16h, a 25°C. Explantes cotiledonares foram removidos dessas plântulas com 8 dias de idade (após semeadura) e foram incubados em meio MS contendo vitaminas B5, 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar, suplementado com diferentes concentrações de ANA (0.1-1.0 μM), durante 10 dias em sala com fotoperíodo de 16h, a 25°C. Foram inoculados 20 explantes por placa de Petri. Cada placa foi considerada como uma repetição e foram feitas 5 repetições para cada tratamento (genótipo e concentração de ANA). Após esse período, o experimento foi avaliado quanto à taxa de explantes que formaram raízes e quanto ao número de raízes por explante.

Para o experimento de alongamento do hipocótilo, os explantes (segmentos de hipocótilo) foram retirados de plântulas com 10 dias de idade (após semeadura) crescidas em casa de vegetação. Os explantes foram coletados com um gabarito de 12 mm e colocados em recipientes contendo solução tampão de Kelly e Bradford (1986) e diferentes concentrações de AIA. Após 24 horas, os hipocótilos foram digitalizados em 300 dpi e as imagens geradas foram impressas em aumento de 200%. Após a impressão, as imagens foram medidas com régua e foi verificado o alongamento do hipocótilo nos diferentes tratamentos em relação ao controle (solução tampão sem auxina). Foram realizadas 10 repetições por tratamento.

5.2.6. Partenocarpia e gravitropismo

Botões florais de MT e dos mutantes c e e foram polinizados manualmente ou emasculados para verificar o pegamento do fruto e a partenocarpia. Os botões florais foram emasculados (retirada das anteras) 1 dia antes de sua abertura (antese) com auxílio de uma pinça. Para a polinização manual, os botões florais emasculados receberam pólen retirado de flores completamente abertas. Foram mantidas as primeiras 6 flores de cada planta. Os demais

botões florais foram retirados desde o início de seu desenvolvimento. Para o tratamento com emasculação das flores sem posterior polinização manual, foram emasculados os 6 primeiros botões florais de cada planta e os demais foram retirados. Foi verificado o peso dos frutos maduros desenvolvidos a partir de flores emasculadas e de flores polinizadas manualmente.

O gravitropismo foi verificado no caule e nas raízes. No primeiro, plantas com 35 dias de idade (após semeadura) cultivadas em casa de vegetação foram colocadas na horizontal para verificar a curvatura do caule. Elas foram mantidas nessa posição durante 5h. Após esse período foi observado se houve ou não curvatura do caule para cima, o que indicaria o gravitropismo negativo da parte aérea. No segundo, plântulas cultivadas *in vitro* foram colocadas em placas de Petri após a germinação, e estas foram colocadas na posição vertical para verificar a ocorrência ou não da curvatura das raízes para baixo (gravitropismo positivo) após um período de 10 dias.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Introgressão das mutações no "background" MT e obtenção dos duplos mutantes

Os mutantes dgt, e e c foram introgredidos na cultivar MT através de cruzamentos e retrocruzamentos sucessivos até a geração BC₆F₃. Dessa forma, o trabalho foi conduzido com linhagens quase isogênicas (NILs, Near Isogenic Lines) de mutantes, eliminando o problema de comparação entre mutantes de diferentes "backgrounds" genéticos (KOORNNEEF, 2002). Os fenótipos mutantes que podem ser identificados dependem, em última análise, do genótipo do tipo selvagem. Por exemplo, fenótipos de genes mutados, para os quais o tipo selvagem carrega um alelo funcionalmente nulo (ambos mutados ou silenciados) ou fraco, podem não ser detectados. Além disso, interações epistáticas (como conseqüência, por exemplo, da redundância de ambas funções gênicas e vias genéticas) assegurarão que alguns fenótipos serão evidentes somente em certos "backgrounds" genéticos (ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF, 2000). Na geração BC₆F₃ os mutantes têm 99.2 % de similaridade com MT, especialmente no que se refere ao tamanho das plantas (Figura 8), pois todas contêm agora os genes de nanismo (*dwarf*) e de crescimento determinado (*self pruning*) de MT.

Partindo-se dos mutantes já introgredidos, foram criados os duplos mutantes $c \, dgt$ e $dgt \, e$, para verificar se essas mutações poderiam estar na mesma via de sinalização de auxina que dgt, observando-se o tipo de interação entre essas mutações nos duplos mutantes. Os duplos mutantes foram obtidos a partir do cruzamento de linhagens quase isogênicas de dgt

com *c* e dgt com *e*, sendo a seleção dos duplos mutantes baseada no fenótipo interativo entre as duas mutações. Todas as análises foram realizadas com os mutantes em BC₆F₃ e com os duplos mutantes na geração F₃, ou seja, em linhagens homozigotas e estáveis.

5.3.2 Caracterização dos mutantes e duplos mutantes

O mutante *diageotropica* (*dgt*) de tomateiro apresenta um fenótipo pleiotrópico que inclui lenta resposta ao gravitropismo, ausência de raízes laterais, dominância apical reduzida, desenvolvimento vascular alterado e crescimento do fruto reduzido (COENEN; LOMAX, 1998; BALBI; LOMAX, 2003; RICE; LOMAX, 2000; ZOBEL, 1973, 1974). A sensibilidade à auxina é reduzida nesse mutante com respeito ao alongamento do hipocótilo e à produção de etileno (KELLY; BRADFORD, 1986). No entanto, os níveis endógenos (FUJINO et al., 1988b) ou o transporte (RICE; LOMAX, 2000) de auxina não são alterados em *dgt*. A mutação *dgt* parece afetar a expressão de apenas um subconjunto dos genes regulados por auxina de uma maneira dependente do tecido e do estágio de desenvolvimento (BALBI; LOMAX, 2003; MITO; BENNETT, 1995; NEBENFUHR; WHITE; LOMAX, 2000). O gene DGT foi clonado e verificou-se que ele codifica uma ciclofilina (CYP), um novo componente envolvido na sinalização de auxina (OH; IVANCHENKO; WHITE, 2005). No "background" MT, apenas a redução na dominância apical do mutante *dgt* não é tão evidente como no parental.

A mutação *entire* (*e*) causa redução no número de folíolos, o que faz com que ele tenha um aspecto foliar menos complexo que o tipo selvagem (RICK; BUTLER, 1956), podendo ser caracterizado como um mutante com folhas pseudo-simples (HAREVEN et al., 1996). Nesse mutante, a formação dos folíolos laterais se dá mais tarde do que no tipo selvagem, porém esse processo é finalizado antes no mutante, o que caracteriza a expansão da lâmina foliar como mais rápida no mutante (DENGLER, 1984). Na fase juvenil, as folhas são verdadeiramente simples, mais tarde, porém, alguns folíolos se desenvolvem (DENGLER, 1984), fusionados com o folíolo terminal, como sugerido também pela orientação alterada das veias na metade distal da estrutura (HAREVEN et al., 1996). Dependendo do "background" genético, mais ou menos extremo é o arranjo foliar formado (HAREVEN et al., 1996). No "background" MT (Figura 8B), as folhas têm praticamente o mesmo aspecto que no parental. Kessler et al. (2001) propuseram que o produto do gene ENTIRE atua na partição do primórdio foliar em folíolos. Adicionalmente, plantas *e* têm muitas características comuns com plantas antisense para o gene Aux/IAA9 (*AS-IAA9*), o qual é um mediador essencial de

auxina nos processos de pegamento do fruto e de morfogênese foliar e que agiria como um repressor na via de resposta à auxina (WANG et al., 2005). A regulação negativa de IAA9, via antisense, resultou em plantas mais sensíveis à auxina. As semelhanças entre o mutante e e *AS-IAA9* sugerem que essa mutação também ocorre em uma das proteínas Aux/IAA. Com essa proteína mutada (mutante e), a repressão à transdução de sinal não ocorreria mais e a planta passaria a ser mais sensível a esse hormônio. Considerando essa possibilidade, o duplo mutante *dgt e* foi obtido para as análises fisiológicas. A constatação de que DGT é epistático a ENTIRE seria uma grande evidência de que e possa ser mesmo uma mutação em um gene Aux/IAA.

O mutante *potato leaf* (*c*) apresenta folhas menos complexas que o MT, com um folíolo terminal e um ou dois folíolos marginais, os quais são muito menores que o folíolo terminal (KESSLER et al., 2001). Esse mutante ainda não foi caracterizado molecularmente mas, por apresentar folhas parecidas com as folhas do mutante *e* (que pode ser um mutante com sensibilidade à auxina alterada), ele também foi analisado e o duplo mutante com *dgt* foi feito. Até o início da antese, MT e os mutantes *c* e *e* apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea e mais flores abertas do que o mutante *dgt* e os duplos mutantes *c dgt* e *dgt* e (Figura 8A). A partir daí, houve uma leve tendência inversa no crescimento, ou seja, o mutante *dgt* e os duplos mutantes tiveram seus caules mais alongados do que MT e os mutantes simples (Figura 9). O caule das plantas e o pecíolo das folhas de MT, *c* e *e* apresentaram-se mais espessos do que em *dgt*, *c dgt* e *dgt* e (Figura 8). A menor espessura do caule pode estar diretamente relacionada com o maior crescimento da parte aérea nestes últimos genótipos. O fenótipo do caule e das folhas dos duplos mutantes *c dgt* e *dgt* e sugere um efeito aditivo entre *dgt* e *c*, e entre *dgt* e *e*.



Figura 8. Fenótipo das plantas e das folhas. **A.** Plantas cultivadas em casa de vegetação e fotografadas aos 40 dias de idade, quando estavam no início da antese. **B.** Folhas completamente expandidas.



Figura 9. Curva de crescimento da parte aérea durante 5 semanas desde o transplantio. Aos 32 dias as plantas já estavam entrando na antese (plantas com os primeiros botões florais). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 150 mL. Barras de erro representam a média ± SE, n=10.

Para verificar se DGT é epistático a ENTIRE e a POTATO LEAF e se as mutações e e c alteram a sensibilidade à auxina, foram verificados alguns caracteres de desenvolvimento com mutantes simples e duplos.

Alguns dos efeitos clássicos da auxina no desenvolvimento das plantas incluem o alongamento ou crescimento do hipocótilo (COLLETT; HARBERD; LEYSER, 2000; GRAY et al., 1998), a formação de raízes laterais (CASIMIRO et al., 2001; FUKAKI et al., 2002) e o gravitropismo (MARCHANT et al., 1999; RICE; LOMAX, 2000). Outros efeitos também associados com auxinas incluem arquitetura foliar (WANG et al., 2005), formação de raízes em explantes cultivados *in vitro* (WANG et al., 2005) e partenocarpia (SERRANI et al., 2007; WANG et al., 2005).

Alterações na forma da folha estão associadas com mudanças no seu padrão de vascularização, o que sugere uma ligação com expansão, divisão e diferenciação celular (DENGLER; KANG, 2001). Apesar de os mecanismos moleculares que controlam a diferenciação vascular e a morfogênese foliar durante a ontogênese de um órgão vegetal ainda não terem sido completamente elucidados, algumas observações têm relacionado a auxina com a formação dos tecidos vasculares, incluindo a formação do feixe vascular em resposta à aplicação local de auxina (SACHS, 2000) e os efeitos do transporte prejudicado de auxina no padrão de vascularização (KOIZUMI et al., 2005; MATTSSON; SUNG; BERLETH, 1999). Resultados obtidos com plantas antisense para o gene Aux/IAA9 indicam que o rompimento de um correto padrão de distribuição ou de resposta à auxina pode afetar o correto estabelecimento da arquitetura foliar (WANG et al., 2005). Em conseqüência, alterações na arquitetura foliar refletem diretamente na área e conseqüentemente no índice de recorte da folha. Esses parâmetros foram avaliados nos mutantes e duplos mutantes, utilizando-se folhas completamente expandidas removidas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Todos os mutantes simples e duplos apresentaram perímetro e área foliar significativamente menor que MT (Figura 10A-B). Os resultados sugerem uma interação sinergística entre dgt e c e entre dgt e e, considerando que os duplos mutantes têm menor área foliar do que os mutantes simples. Por outro lado, a razão entre o perímetro e a área das folhas foi maior apenas no mutante dgt (Figura 10C). Para este parâmetro, parece que existe uma relação de epistasia entre os mutantes dgt e c, já que não houve alteração na razão perímetro/área do duplo mutante c dgt quando comparado ao mutante c. Diferentemente, a interação entre dgt e e parece ter efeito aditivo, já que o duplo mutante dgt e apresentou razão perímetro/área intermediária entre dgt e e (Figura 10C).



Figura 10. Perímetro (A), área foliar (B) e relação perímetro/área (C) das folhas. As medidas foram tomadas de folhas completamente expandidas usando o programa Quant. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).

5.3.3 Sensibilidade à auxina

Para melhor investigar se os mutantes c e e tinham maior sensibilidade à auxina, dois experimentos de dose-resposta foram feitos, verificando-se a formação de raízes em explantes cotiledonares *in vitro* e o alongamento de segmentos de hipocótilo em doses crescentes de

auxina. A figura 11 mostra que as doses 0.1 µM e 0.5 µM de ANA promoveram maior regeneração (explantes com raízes) no mutante e do que nos demais genótipos. Adicionalmente, houve maior formação de raízes por explante na dose de 0.5 µM também no mutante e (Figura 11B). Esses resultados indicam que esse mutante pode ser mais sensível à auxina e/ou ter maior competência para formar raízes. A dose de 1.0 µM já é considerada acima da ótima e, nessa concentração, a auxina ainda promove a formação de raízes (Figuras 11 e 12) mas inibe o desenvolvimento delas, resultando em raízes mais curtas, "inchadas" e pilosas (Figura 12). Esse efeito inibitório de ANA parece ser um pouco acentuado no mutante e em 1.0 µM de ANA, quando comparado com MT, dgt e c, indicando que ele pode ser mais sensível ao efeito inibitório de auxina. Como esperado, a regeneração de raízes foi menor no mutante dgt (Figuras 11 e 12), já que ele é menos sensível à auxina. No entanto, a mutação e parece ter suprimido parcialmente essa deficiência de dgt no duplo mutante dgt e, o que não aconteceu com o duplo mutante c dgt (Figuras 11 e 12). Tanto para os parâmetros de taxa de explantes com raízes (Figura 11A) quanto para o número de raízes por explante (Figura 11B), as mutações dgt e e parecem ter efeito aditivo, e isso implica em dizer que ambos estaria afetando a sinalização de auxina, porém de maneiras opostas e em vias separadas. Quanto aos mutantes c e dgt, para ambos os parâmetros não parece haver interação, já que c não diferiu de MT, indicando que a mutação c não estaria interferindo na sensibilidade à auxina.

Wang et al. (2005) também observaram o efeito de ANA na formação de raízes em explantes cotiledonares de plantas antisense para o gene Aux/*IAA9*, as quais têm o fenótipo da folha idêntico ao de plantas carregando a mutação *e*. A indução de raízes foi promovida em 0.1 μ M de ANA no tipo selvagem e em concentração 10 vezes menor (0.01 μ M) nas plantas transgênicas *AS-IAA9*. Diversos fenótipos associados com a regulação negativa de *IAA9* sugerem maior sensibilidade à auxina (WANG et al., 2005).

Como alongamento ou crescimento do hipocótilo é um efeito clássico da auxina (COLLETT; HARBERD; LEYSER, 2000; GRAY et al., 1998), esse efeito também foi verificado nos mutantes simples e duplos, juntamente com o controle MT. O alongamento de segmentos de hipocótilo foi verificado em plântulas com 10 dias de idade, crescidas em casa de vegetação. Em MT, c e e, o alongamento do hipocótilo foi proporcional à concentração de AIA, enquanto em *dgt*, *c dgt* e *dgt e* não houve alongamento, mesmo na maior concentração de AIA utilizada (Figura 11C), o que sugere que a mutação *dgt* tem um efeito epistático sobre as mutações *c* e *e*, já que essas mutações não foram capazes de reverter a insensibilidade de *dgt* nos duplos mutantes. A partir de 0.1 μ M de AIA houve uma leve tendência a um maior

alongamento do hipocótilo no mutante *e* (Figura 11C), sugerindo maior sensibilidade à auxina nesse mutante. Por outro lado, como esse parâmetro não foi tão afetado no mutante *e*, sugerese que o gene ENTIRE pode ter sua expressão restrita a algum órgão específico e/ou estágio de desenvolvimento, sendo pouco expresso em hipocótilos.

Embora os resultados de formação de raízes *in vitro* tenham indicado que o mutante *c* não estaria interferindo na sensibilidade à auxina, a curva de dose-resposta à auxina em segmentos de hipocótilos indicou um leve aumento na sensibilidade à auxina nesse mutante, já que houve maior alongamento do hipocótilo em 0.1 μ M de AIA em *c* enquanto isso não foi verificado nos demais genótipos para essa concentração de AIA (Figura 11C). Como já mencionado anteriormente (item 3.3.2), a mutação *c* ainda não foi caracterizada molecularmente. Recentemente, o seqüenciamento do fator de transcrição *Blind-like2 (Bli2)*, da família gênica MYB, em 6 acessos de *potato leaf* (*c*) provou que *Bli2* e *c* são o mesmo gene. *Bli2* age como um regulador chave da complexidade, número de lóbulos e serração foliar. O fenótipo de linhagens mutantes *bli2* obtidas via TILLING é semelhante ao fenótipo do mutante *Bli2*, foi isolado por clonagem posicional e verificou-se que o fenótipo do mutante é causado pela perda de função de um gene da família MYB, da classe R2R3 (SCHMITZ et al., 2002).

Os fatores MYB são encontrados em plantas e animais (ROSINSKI; ATCHLEY, 1988) e o tipo R2R3 é encontrado em plantas e compreende uma família gênica em *Arabidopsis* (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001). Um grande número de fatores de transcrição MYB regula muitos processos nas plantas, incluindo a síntese de metabólitos secundários, diferentes aspectos do desenvolvimento, respostas de estresse abiótico, etc (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001). Embora R2R3 não tenha sido previamente implicado na sinalização de auxina, um trabalho prévio mostrou que a expressão de alguns membros dessa família é regulada positivamente pela auxina (KRANZ et al., 1998) e age em combinação com os ARFs (SHIN et al., 2007). A partir dessas considerações, pode-se sugerir que a mutação c estaria afetando parcialmente a sensibilidade à auxina, mas estaria "upstream" à mutação dgt.

¹ Informação fornecida por Busch, Schmitz, Bendahmane e Theres no 5º Workshop em Genoma de Solanaceae (The 5th Solanaceae Genome Workshop), em 2008.



Figura 11. Formação de raízes em explantes cotiledonares incubados em diferentes concentrações de ANA. A. Porcentagem de gemas com explantes. B. Número de raízes por explante. C. Ensaio de dose-resposta à auxina em segmentos de hipocótilo com 10 dias de idade. O alongamento do hipocótilo é dado como porcentagem do comprimento final depois de 24 horas de incubação na solução contendo a concentração indicada de AIA em relação ao comprimento do controle (sem auxina).A-B. Barras de erro representam a média ± SE, n=5.



Figura 12. Formação de raízes em explantes cotiledonares incubados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ANA.

5.3.4 Auxina e respostas à partenocarpia e gravitropismo

Auxinas têm sido relacionadas com indução no pegamento e crescimento do fruto e, por conseqüência, com a partenocarpia (SERRANI et al., 2007; WANG et al., 2005). O desenvolvimento do fruto normalmente ocorre após a fertilização do ovário e é definido como a mudança da condição estática do ovário na flor para a condição de crescimento rápido de frutos. Experimentos de aplicação de giberelinas (GAs) em ovários não-polinizados (ALABADÍ; CARBONELL, 1998; FOS; NUEZ; GARCÍA-MARTÍNEZ, 2000; FOS et al, 2001) e de inibidores da biossíntese de GA em ovários polinizados (FOS; NUEZ; GARCÍA-MARTÍNEZ, 2000; FOS et al, 2001) sugerem que o pegamento do fruto em tomateiro é dependente de GAs. A superexpressão de genes de biossíntese de auxina (PANDOLFINI et al., 2002) e a aplicação de auxina (ABAD; MONTEIRO, 1989; KOSHIOKA et al., 1994) também induzem o pegamento e crescimento do fruto, e geralmente de maneira mais eficiente que GAs (ALABADÍ et al., 1996, ALABADÍ; CARBONELL, 1998). Serrani et al. (2007) observaram a formação de frutos partenocárpicos induzidos por GAs e auxinas e sugerem que ambos os hormônios são necessários para o desenvolvimento normal do fruto após a polinização. Plantas transgênicas apresentando regulação negativa do gene Aux/IAA9 apresentaram capacidade de desenvolver frutos partenocárpicos sem aplicação de hormônios (WANG et al., 2005).

O peso de frutos desenvolvidos a partir de plantas onde as flores foram emasculadas ou polinizadas manualmente foi verificado em MT e nos mutantes c e e. Em MT e no mutante c, os frutos se desenvolveram mais em plantas cujas flores foram polinizadas manualmente do que em plantas com flores emasculadas, enquanto no mutante e, não houve diferença significativa no peso dos frutos em ambos tratamentos (Figura 13), sugerindo que esse mutante apresenta maior nível de partenocarpia, reforçando a possibilidade de que ele seja mais sensível à auxina.



Figura 13. Peso do fruto mensurado em plantas polinizadas manualmente e em plantas emasculadas (frutos partenocárpicos). As plantas foram cultivadas em vasos de 150 mL. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Os dados oriundos de plantas polinizadas manualmente e de plantas emasculadas foram comparados entre si para cada genótipo. **Diferenças significativas (P<0.01); n.s., não significativo (t de Student).</p>

Desde a germinação da semente, o caule segue a orientação para crescer de maneira ascendente enquanto as raízes crescem de maneira descendente, independentemente da orientação original da semente no solo. De fato, ambos os órgãos são dotados com um sofisticado mecanismo que permite que eles percebam a direção da gravidade e guie seu crescimento em um ângulo específico a partir do solo. Esse processo é chamado de gravitropismo (MASSOM et al., 2002). Auxinas estão envolvidas na transmissão de sinal desde o local de percepção da gravidade até o local de resposta à curvatura, e a direção da transdução de sinal à gravidade difere entre caules e raízes. A auxina é redistribuída lateralmente através dos órgãos estimulados pela gravidade (MASSOM et al., 2002). O gradiente lateral de auxina formado promove então um alongamento celular diferenciado no lado oposto do órgão estimulado, responsável pela curvatura do órgão. A sensibilidade diferencial de células do caule e da raiz à auxina seria responsável pela curvatura diferencial nesses órgãos: para cima e para baixo (TREWAVAS, 1992). Mutações que afetam o transporte e/ou resposta à auxina interferem no gravitropismo, como as mutações axrl de Arabidopsis (TIMPTE; WILSON; ESTELLE, 1992) e dgt de tomateiro (BALBI; LOMAX, 2003).

Como os resultados obtidos nos experimento anteriores sugerem maior sensibilidade à auxina no mutante *e*, o gravitropismo da raiz e da parte aérea foi verificado. Para o experimento com a parte aérea, foram utilizadas plantas com 32 dias de idade (após semeadura) cultivadas em casa de vegetação. As plantas foram fotografadas no tempo zero

(assim que foram colocadas na horizontal) e após 5h. Em MT e no mutante e, houve curvatura normal da parte aérea após as 5h, enquanto no mutante dgt não houve resposta ao gravitropismo (Figura 14A). No duplo mutante dgt e, a mutação e reverteu parcialmente a insensibilidade do mutante dgt, mostrando uma singela curvatura da parte aérea após 5 h na posição horizontal (Figura 14A). Para verificar o gravitropismo na raiz, foram utilizadas plântulas cultivadas *in vitro*. MT e o mutante dgt e apresentaram gravitropismo normal na raiz (Figura 14B). O mutante dgt e o duplo mutante dgt e apresentaram resposta quase nula ao gravitropismo na raiz (Figura 14B), evidenciando que, para essa resposta, e não conseguiu reverter o fenótipo de dgt.



Figura 14. Gravitropismo na raiz e na parte aérea. A. Plantas cultivadas em casa de vegetação aos 35 dias de idade (início da formação dos primeiros botões florais). Os vasos foram mantidos na horizontal para verificar a curvatura do caule para cima (gravitropismo negativo) após 5 h. B. Plântulas cultivadas *in vitro* foram colocadas em placas de Petri após a germinação, e estas foram colocadas na posição vertical, para verificar a curvatura das raízes para baixo (gravitropismo positivo) após 10 dias.
5.4 Conclusões

A partir dos resultados obtidos, algumas conclusões podem ser feitas: 1) a mutação cnão aumenta consideravelmente a sensibilidade à auxina e estaria influenciando apenas na arquitetura foliar; 2) o mutante e parece ser mais sensível à auxina com relação aos seguintes parâmetros: capacidade de formar raízes *in vitro*, recorte foliar e partenocarpia. É possível que essa mutação seja fraca e/ou suprida pelos demais genes, já que ele parece ser membro da família gênica Aux/IAA. Além disso, e estaria numa via de sinalização separada de *dgt*.

6. CONTROLE DO DESENVOLVIMENTO VEGETAL PELO BALANÇO AUXINA-CITOCININA E PELO NÍVEL ABSOLUTO DE CADA HORMÔNIO: MUTANTES, DUPLOS MUTANTES E PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATEIRO COMO MODELO

Resumo

Uma das descobertas cruciais para o entendimento do desenvolvimento vegetal foi feita a mais de 50 anos atrás, quando Folke Skoog e Carlos Miller propuseram que o controle da organogênese in vitro não é feito pelo nível absoluto, mas pelo balanço relativo dos hormônios auxina e citocinina. A partir desse trabalho pioneiro, muito tem sido feito para se entender como auxina e citocinina interagem, sendo boa parte do esforço dedicado ao estudo de como cada um desses hormônios pode influenciar a biossíntese, a inativação e a transdução de sinal do outro. Contudo, relativa menor atenção tem sido dada à possibilidade de se estenderem os achados de Skoog e Miller para outras respostas de desenvolvimento diferentes do controle da formação de caules e raízes *in vitro*. No presente trabalho, mutantes, duplos mutantes e plantas transgênicas de tomateiro foram utilizados para inferir quais respostas de desenvolvimento seriam controlados pelos níveis absolutos de auxina e citocinina e quais seriam controlados pelo balanço auxina-citocinina. Para citocinina, foram usadas plantas contendo a mutação brt, que confere pouca sensibilidade à citocinina, e plantas transgênicas superexpressando o gene CKX2 de Arabidopsis, o qual produz plantas com reduzido nível endógeno desse hormônio. Para auxina, foi utilizado o mutante dgt, que é pouco sensível a esse hormônio. Foram ainda utilizados os duplos mutantes brt dgt e dgt CKX2. Todos os genótipos utilizados estavam no "background" Micro-Tom (MT). Somente os processos de organogênese in vitro (formação de caules e raízes em explantes cotiledonares) e a dominância apical ex vitro, os quais são reconhecidamente relacionados com a diferenciação celular, mostraram ser afetados pelo balanço auxina-citocinina. Todas as demais respostas de desenvolvimento, as quais parecem ser mais dependentes do efeito de auxina e citocinina na divisão e expansão celular, mostraram estar mais relacionadas com status absoluto de cada uma dessas classes hormonais.

Palavras-chave: balanço auxina-citocinina, divisão, expansão, diferenciação, desenvolvimento

6. DEVELOPMENTAL RESPONSES CONTROLLED BY THE AUXIN-TO-CYTOKININ BALANCE AND BY EACH HORMONE ABSOLUTE STATUS: MUTANT, DOUBLE MUTANT AND TRANSGENIC TOMATO PLANTS AS A MODEL

Abstract

One of the pinpoint discoveries in the understanding of plant development was made more than 50 year ago by Folke Skoog and Carlos Miller, who stated that the process of in vitro organogenesis is not the effect of the absolute level, but the relative balance of auxin and cytokinin hormones. Since these seminal works, a considerable number of studies were done to understand how auxin and cytokinin interacts. Most of these efforts were concentrated in the study of how these hormones influence each other regarding their biosynthesis, inactivation and signal transduction. However, a relative minor attention has been put in checking whether the findings of Skoog and Miller can be extended to developmental responses other than in vitro shoot and root formation. Here, mutant, double mutant and transgenic tomato plants were used to infer which developmental responses are controlled by the absolute level of auxin and cytokinin and which ones are controlled by the auxin-tocytokinin balance. For cytokinin, it was used plants harbourig the brt mutation, which confers low response to cytokinin, and transgenic plants overexpressing the Arabidopsis CKX2, which reduces the endogenous levels of this hormone. For auxin, it was used the mutant dgt, which is low sensitive to this hormone. The double mutants brt dgt and dgt CKX2 were also used. All genotypes were in the same genetic background Micro-Tom (MT). Only in vitro organogenesis processes (shoot and root formation from cotyledoray explants) and ex vitro apical dominance, which are known to be related to cell differentiation, proved to be controlled by the auxin-to-cytokinin ratio. All other developmental processes, which were most likely related to effect of auxin and cytokinin in cell division and expansion, seemed to be controlled by the absolute level of each one of these hormones.

Keywords: auxin-to-cytokinin balance, division, expansion, differentiation, development

6.1 Introdução

Os hormônios auxina e citocinina são essenciais desde as etapas iniciais do desenvolvimento, pois afetam os processos de divisão, expansão e diferenciação celular (BERLETH; SACHS, 2001; HOBBIE, 1998; ZHANG; DIEDERICH; JOHN, 2005), até o final do ciclo de vida das plantas, onde interferem em processos como amadurecimento do fruto (LEWIS et al., 1996; MANNING, 1994) e senescência (ELLIS et al., 2005; MCKENZIE et al., 1998; MOK, 1994). Por serem hormônios cruciais para a viabilidade das plantas, nenhum mutante com deficiência total em auxina ou citocinina tem sido encontrado (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O efeito do balanço auxina/citocinina durante o desenvolvimento das plantas é um fenômeno conhecido desde os trabalhos pioneiros de Skoog e Miller (1957). Desde então, o balanço entre esses "fatores de crescimento" no desenvolvimento das plantas tem sido extensivamente estudada, utilizando-se mutantes (LAXMI et al., 2006; PERNISOVÁ et al., 2009; TIMPTE et al., 1995; WARD; LEYSER, 2004), plantas transgênicas (EKLÖF et al., 2000; NORDSTRÖM et al., 2004; PERNISOVÁ et al., 2009), expressão gênica (PERNISOVÁ et al., 2009; TANAKA et al., 2006;) e a aplicação exógena de um desses hormônios para alterar respostas do outro hormônio (PALNI; BURCH; HORGAN, 1988; PERNISOVÁ et al., 2009; ZHANG et al., 1995).

Embora a interação entre auxinas e citocininas já tenha sido alvo de vários estudos, o controle do desenvolvimento pelo balanço entre essas duas classes hormonais ainda precisa ser melhor compreendido, desde os primeiros trabalhos de Skoog e Miller (1957). Plantas com alterações no metabolismo e/ou sensibilidade à auxina ou citocinina permitem estudar a função de cada um desses hormônios individualmente e/ou conjuntamente no desenvolvimento da planta. Este trabalho teve como objetivo estudar o papel da interação e do balanço auxina/citocinina no controle do desenvolvimento utilizando-se diferentes genótipos da cultivar Micro-Tom de tomateiro, através do uso de plantas mutantes e transgênicas e combinações de duplos mutantes, os quais possuem alterações no metabolismo e/ou sensibilidade à auxina e citocinina. Dessa forma, foram geradas plantas transgênicas com reduzidos níveis endógenos de citocinina, através da expressão constitutiva do gene *AtCKX2*. Adicionalmente, os mutantes *diageotropica (dgt)* e *bushy root (brt)* com pouca sensibilidade à auxina (OH; IVANCHENKO; WHITE, 2005) e citocinina (PINO-NUNES, 2005), respectivamente, foram utilizados para estudos comparativos e obtenção de duplos mutantes. Isso possibilitou inferir quais são as respostas de desenvolvimento que podem ser atribuídas

ao balanço entre essas duas classes hormonais e quais são associadas ao valor absoluto de cada uma delas.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Material vegetal e obtenção de duplos mutantes

Neste trabalho foram utilizadas plantas mutantes e transgênicas, as quais foram utilizadas para obtenção de duplos mutantes, e o controle Micro-Tom (MT). As sementes de Micro-Tom (MT) foram gentilmente cedidas pelo Dr. A. Levy, do Instituto de Ciências de Weizmann, Israel e as sementes dos mutantes *diageotropica* (*dgt*) e *bushy root* (*brt*) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Chetelat da Universidade da Califórnia em Davis. Os mutantes *brt* (PINO-NUNES, 2005) e *dgt* (CARVALHO, 2007) foram previamente obtidos no "background" MT; A obtenção das plantas transgênicas (*MT CKX2* e *dgt CKX2*) está descrita no item 6.2.2. O duplo mutante *brt dgt* foi obtido através de cruzamento convencional entre os dois mutantes. *brt* foi usado como receptor e *dgt* como doador de pólen. As plantas originadas desse cruzamento (F₁) foram autofecundadas, gerando sementes F₂, as quais foram semeadas em bandeja. Em F₂, surgiram plantas com fenótipo normal (plantas heterozigotas para as duas mutações, 9:16), plantas com fenótipo *dgt* (3:16), plantas com fenótipo *brt* (3:16) e, em menor proporção (1:16), plantas com fenótipo intermediário entre as mutações (duplo mutante *brt dgt*), apresentando folhas hiponásticas (como *dgt*) e verde-claras (como *brt*).

6.2.2 Obtenção de plantas transgênicas de tomateiro superexpressando AtCKX2

As plantas transgênicas foram obtidas via transformação com *Agrobacterium tumefaciens* de acordo a metodologia descrita no Apêndice B. Como vetor foi utilizado o plasmídio pROKII, contendo o gene *neomicina fosfotransferase II (nptII)*, o qual confere resistência à canamicina. A seqüência do gene *AtCKX2* foi clonada nesse plasmídio sob o controle do promotor *CaMV 35S. A. tumefaciens* cepa GV3101 foi transformada via eletroporação para a inserção do plasmídio. Para essa cepa, foram utilizados no meio de cultivo da *Agrobacterium* os seguintes antibióticos: rifampicina (50 mg/L), gentamicina (25 mg/L) e canamicina (50 mg/L). Foram utilizados os genótipos MT e *dgt* para obtenção de *MT CKX2* e *dgt CKX2*, respectivamente.

6.2.3 Análises relacionadas ao desenvolvimento vegetativo

Para verificar o padrão de desenvolvimento das raízes de plântulas, sementes dos genótipos foram germinadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais, metade da concentração das vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), 15 g/L de sacarose e 2.3 g/L de phytagel. Após a semeadura, os frascos contendo as sementes foram mantidos durante 4 dias no escuro e em seguida foram transferidos para sala com fotoperíodo de 16h, a 25°C, onde foram mantidos por mais 8 dias. As plântulas foram então retiradas do meio de cultura, suas raízes foram lavadas com água destilada, enxugadas e fotografadas. Para verificar o padrão de desenvolvimento da parte aérea, as plantas foram crescidas em casa de vegetação e fotografadas no momento da antese, para observação do aspecto morfológico de folhas totalmente expandidas e do crescimento de gemas axilares.

Para mensurar perímetro e área foliar, folhas completamente expandidas foram retiradas de plantas adultas cultivadas em casa de vegetação e foram digitalizadas (Scanner HP Scanjet 2400) com resolução de 100 dpi. As imagens geradas foram analisadas pelo programa Quant (Quant v.1.0.1) para mensurar a área foliar e o perímetro. A partir desses dados, o índice de recorte das folhas foi obtido dividindo-se o perímetro da folha pela sua área. O comprimento das gemas laterais foi medido quando as plantas iniciaram a antese. Foram medidas desde a primeira até a quarta gema adventícia, no sentido da base para o topo da parte aérea.

6.2.4 Análises relacionadas ao desenvolvimento reprodutivo

O tempo para antese foi contado desde a semeadura até a abertura do primeiro botão floral. Na antese foi verificado o número de folhas por planta. O número de flores por inflorescência foi verificado na segunda inflorescência de cada planta e o tempo para amadurecimento do fruto foi contado desde a antese até a colheita do primeiro fruto maduro. O peso de 100 sementes foi verificado em sementes que foram retiradas dos frutos e secas em condições de temperatura ambiente ao ar livre durante 2 dias. O número de sementes por fruto foi verificado em frutos maduros e bem desenvolvidos, sendo estes os primeiros frutos maduros de cada planta.

O peso do fruto foi verificado em frutos maduros e a produção por planta foi considerada dentro de um período de 5 meses (desde o plantio até a última colheita). O teor de

sólidos solúveis totais, expressos em graus Brix foi medido em frutos maduros e bem desenvolvidos, utilizando-se um refratômetro digital (Atago PR-101, Japão).

Para verificar a acidez total titulável, a polpa de frutos maduros e bem desenvolvidos foi processada. Em seguida, 10 g dessa amostra foram pesadas, colocadas numa proveta e o volume foi completado para 100 mL. A essa solução foram adicionadas gotas de NaOH 0.1 N até que ela atingisse pH = 8.1. O cálculo da acidez foi baseado no volume de NaOH utilizado, como segue:

Fórmula:	% acidez = mL NaOH . N . E . 10 . g amostra ⁻¹
Onde,	N = normalidade padrão do NaOH (0.1 N)
	E = equivalente grama do ácido predominante

No caso do tomateiro, o ácido predominante é o ácido cítrico (CHITARRA; CHITARRA, 1990), cujo equivalente grama é igual a 64.02.

6.2.5 Análises relacionadas à morfogênese in vitro

Para o experimento de formação de gemas caulinares, plântulas foram germinadas e crescidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais, metade da concentração de vitaminas B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968), 15 g/L de sacarose e 2.3 g/L de phytagel, durante 4 dias no escuro seguidos por incubação por mais 4 dias em sala com fotoperíodo de 16h, a 25°C. Explantes cotiledonares foram removidos dessas plântulas com 8 dias de idade (após semeadura) e foram incubados em meio MS contendo vitaminas B5, 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar, suplementado com 5.0 μM de BAP, durante 21 dias em sala com fotoperíodo de 16h, a 25°C. Foram inoculados 20 explantes por placa de Petri. Cada placa foi considerada como uma repetição e foram feitas 5 repetições para cada tratamento (genótipo). Após esse período, o experimento foi avaliado quanto à taxa de explantes que formaram gemas caulinares.

Para o experimento de formação de raízes, o procedimento para obtenção dos explantes cotiledonares e as condições de cultivo são as mesmas descritas no parágrafo anterior, no entanto o meio MS foi suplementado com 0.4 μ M de ANA e o período de incubação foi de 10 dias. Após esse período, o experimento foi avaliado quanto à taxa de explantes que formaram raízes e quanto ao número de raízes por explante.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Obtenção de plantas transgênicas de tomateiro superexpressando AtCKX2

Plantas transgênicas contendo o gene *CKX2* de *Arabidopsis thaliana* (*AtCKX2*) foram obtidas em tomateiro sob o controle do promotor constitutivo *35S* (*35:CKX2*). A enzima citocinina oxidase/desidrogenase (CKX) catalisa a degradação irreversível de citocininas e, em muitas plantas, é responsável pela maioria da inativação metabólica de citocinina (MOK; MOK, 2001). A superexpressão de *AtCKX* em plantas transgênicas de tabaco e *Arabidopsis* reduziu os níveis endógenos de citocinina e influenciou profundamente o desenvolvimento caulinar e radicular das plantas (WERNER et al., 2001, 2003).

No presente trabalho, plantas T₁, provenientes da autofecundação dos transformantes (T₀), foram selecionadas quanto à resistência à canamicina (400 mg/L) pela aplicação, na forma de spray, durante cinco dias consecutivos em plântulas crescidas na casa de vegetação. O número de plantas resistentes a canamicina nos cinco transformantes independentes obtidos (Tabela 2), sugere que se trata de eventos de cópia única inserida, já que, embora a proporção de resistente para não resistentes não seja exatamente 3:1, a proporção observada está abaixo desse valor e não acima do mesmo, o que caracterizaria mais de uma cópia inserida. As plantas resistentes foram classificadas posteriormente como plantas normais (de tamanho normal, possivelmente plantas heterozigotas) e como plantas pequenas (Tabela 2), as quais tiveram uma redução drástica no desenvolvimento vegetativo e são possíveis plantas homozigotas (Figura 15A). Linhagens T₁ foram avaliadas quanto a diversos parâmetros de desenvolvimento. Em heterozigose, as plantas apresentam alterações marcantes no desenvolvimento e, em homozigose, o efeito é ainda mais marcante (Figura 15A), afetando inclusive o tempo para germinação das sementes (dados não mostrados). Sementes de MT e MT CKX2 foram colocadas para germinar no mesmo dia, no entanto, as trangênicas demoraram mais para germinar, e por isso estavam num estágio fisiológico de desenvolvimento mais precoce 15 dias após a semeadura (Figura 15B). Além disso, seus cotilédones e folhas apresentam coloração verde mais escura do que a coloração das folhas de MT.

Linhagens*	Não- resistentes	Resistentes	Plantas normais	Plantas pequenas
A01	44	67	58	9
A02	22	62	54	8
A03	12	22	21	1
A04	44	69	69	0
A05	6	7	7	0
A06	13	19	19	0

Tabela 2 – Resistência à canamicina e freqüência de possíveis plantas homozigotas (plantas pequenas) na geração T₁.

*As plantas foram selecionadas quanto à resistência à canamicina (400 mg/L) pela aplicação em plântulas crescidas na casa de vegetação. As plantas resistentes foram classificadas posteriormente como plantas normais (de tamanho normal, possivelmente plantas heterozigotas) e como plantas pequenas, as quais tiveram uma redução drástica no desenvolvimento vegetativo e são possíveis plantas homozigotas.



Figura 15. Comparação fenotípica entre plantas controle (MT) e plantas MT CKX2. A. Plantas cultivadas em casa de vegetação aos 45 dias após semeadura. As plantas transgênicas apresentam muitas brotações laterais já na antese. As plantas homozigotas demoram mais para se desenvolverem e entrarem na antese. B. Plântulas de MT e MT CKX2 homozigotas aos 15 dias após semeadura. Notar que as plântulas MT CKX2 não estão no mesmo estágio de desenvolvimento que MT, devido ao atraso na germinação.

Considerando que a expressão constitutiva de *CKX2* resulta em alterações drásticas no desenvolvimento das plantas, especialmente quando em homozigose, a eficiência de transformação com *35S:CKX2* (dados não mostrados) tendeu a ser menor do que a eficiência

com a construção *nos:nptII* (Apêndice 2), a qual não interfere no desenvolvimento. Diferentes níveis de expressão gênica nas linhagens transformadas resultaram em diferentes níveis de alterações no desenvolvimento das plantas. Altos níveis de expressão geram um fenótipo não viável, ou com o desenvolvimento bastante comprometido. Em *Arabidopsis*, plantas *35S:CKX1* e *35S:CKX3* tiveram o desenvolvimento bem mais afetado do que plantas *35S:CKX2* e *35S:CKX4* (WERNER et al., 2003). Altos níveis de expressão podem também comprometer a própria eficiência de transformação, já que a diminuição drástica nos níveis endógenos de citocinina compromete a formação e o desenvolvimento inicial da gema adventícia transformada. Adicionalmente, em homozigose, o fenótipo é ainda mais acentuado, o que compromete o desenvolvimento das plantas e, consequentemente, os estudos a serem realizados. Dessa forma, os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos com linhagens heterozigotas.

6.3.2 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço no desenvolvimento vegetativo

O fenótipo das raízes foi observado em plântulas germinadas e crescidas *in vitro*. Apesar de as plântulas *MT CKX2* estarem num estágio fisiológico de desenvolvimento mais precoce (ainda não apresentam o primeiro par de folhas verdadeiras), já que têm a germinação da semente atrasada, elas apresentam sistema radicular bem desenvolvido e bastante ramificado (Figura 16A), como observado também em plantas 35S:CKX de *Arabidopsis* (WERNER et al., 2003) e tabaco (WERNER et al., 2001). Os mutantes *dgt* e *brt* apresentaram o fenótipo esperado para as raízes, sendo elas sem ramificação e agravitrópicas em *dgt* e curtas e ramificadas em *brt* (Figura 16A).

Nos duplos mutantes *brt dgt* e *dgt CKX2*, o fenótipo das raízes é bem parecido, ou seja, as raízes são mais ramificadas que em *dgt*, porém menos ramificadas que em *brt* e *MT CKX2*, respectivamente (Figura 16A), indicando um efeito aditivo entre eles. Considerando que ambos duplos mutantes são auxina (-) e citocinina (-), onde *brt dgt* compreende menor sensibilidade tanto à citocinina quanto à auxina e *dgt CKX2* compreende menor sensibilidade à auxina e menores níveis endógenos de citocinina, o balanço auxina/citocinina desses duplos mutantes deve ser equivalente a MT. No entanto, os fenótipos das raízes de MT e dos duplos mutantes são bem distintos (Figura 16A), sugerindo que esse parâmetro do desenvolvimento não é controlado pelo balanço auxina/citocinina, e sim pelos níveis absolutos de cada uma dessas classes hormonais.

Em plantas adultas, o fenótipo é bem característico para cada mutação ou transgênico, comparados ao MT. Plantas contendo a mutação *brt* apresentaram menor desenvolvimento da parte aérea e folhas verde claras (Figuras 16B e 17), sendo essas características já conhecidas para esse mutante (PINO-NUNES, 2005). O fenótipo de *dgt* inclui folhas verde escuras e hiponásticas (Figuras 16B e 17). O desenvolvimento foi bastante comprometido no duplo mutante *brt dgt*, e o fenótipo desse genótipo é caracterizado por folhas verde claras e parcialmente hiponásticas (Figuras 16B e 17), sendo isso efeito da interação entre as duas mutações. Nos genótipos transgênicos (*MT CKX2 e dgt CKX2*), a altura das plantas não foi afetada, porém o crescimento (Figura 16B) e a arquitetura foliar (Figura 17) foram bastante alterados pela diminuição nos níveis endógenos de citocinina, o que será discutido posteriormente.

Em todos os genótipos mutados e transgênicos, houve significativa redução no perímetro e na área foliar (Figura 18A-B), o que refletiu diretamente na relação perímetro/área (Figura 18C), sendo essas respostas mais pronunciadas nos duplos mutantes (brt dgt e dgt CKX2). A redução na área foliar de brt e MT CKX2 pode ser atribuída à diminuição da sensibilidade à citocinina e dos níveis endógenos desse hormônio nessas plantas, respectivamente. Durante a formação da folha, a fase de divisão é seguida pela expansão celular e diferenciação. A manutenção da competência meristemática de células da folha define o número total de células e conseqüentemente o tamanho desses órgãos. A habilidade de células individuais de se submeter ao ciclo celular, manter a competência para proliferar, cessar a atividade do ciclo celular, expandir e diferenciar depende de vários sinais externos e endógenos (WERNER et al., 2003). A superexpressão de CKX2 em Arabidopsis levou à redução significativa da área foliar, a qual foi causada primariamente pela diminuição da divisão celular durante o desenvolvimento da folha, que foi compensada parcialmente pelo aumento no tamanho das células, sugerindo que a deficiência de citocinina reduz a taxa de divisão celular e/ou causa o término precoce da diferenciação celular na folha (WERNER et al., 2003).

Em dgt, a menor sensibilidade à auxina estaria causando a redução na área foliar, já que esse hormônio também é requerido para divisão, expansão e diferenciação celular (BERLETH; SACHS, 2001; HOBBIE, 1998). A redução da área foliar nos mutantes e nos transgênicos seria, principalmente, devido à diminuição das taxas de divisão e expansão celular e, dessa forma, esses parâmetros estariam mais relacionados aos níveis absolutos de auxina e citocinina. Isso está de acordo com o fato de que as folhas dos duplos mutantes *brt* dgt e dgt CKX2 diferiram bastante de MT.



Figura 16. Fenótipo das raízes de plântulas e fenótipo de plantas adultas. A. As plântulas foram germinadas e crescidas *in vitro*, e foram fotografadas aos 12 dias após semeadura. Apesar de as plântulas transgênicas estarem num estágio fisiológico de desenvolvimento mais precoce, elas apresentam sistema radicular bem desenvolvido e ramificado. B. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e foram fotografadas aos 40 dias após semeadura. Nessa fase, MT e os mutantes simples estavam entrando na antese, com os primeiros botões florais abertos, enquanto o duplo mutante *brt dgt* e as plantas transgênicas ainda estavam iniciando a formação dos botões florais.



Figura 17. Fenótipo de folhas de MT, mutantes, plantas transgênicas e duplos mutantes. As folhas foram retiradas de plantas cultivadas em casa de vegetação e estavam completamente expandidas. A deficiência e/ou insensibilidade à auxina e/ou citocinina causou redução drástica no desenvolvimento das folhas.



Figura 18. Perímetro (A), área foliar (B) e razão perímetro/área (C) das folhas. As medidas foram tomadas de folhas completamente expandidas usando o programa Quant. A-C. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).</p>

A dominância apical é um dos eventos clássicos de desenvolvimento que se acredita ser controlado pela interação entre auxina e citocinina. Essa idéia é suportada pelas observações fenotípicas em muitos mutantes de *Arabidopsis* deficientes na biossíntese ou sensibilidade à auxina e/ou citocinina (CATTEROU et al., 2002; HOBBIE; ESTELE, 1994), bem como em plantas transgênicas com níveis alterados de auxina ou citocinina (EKLÖF et

al., 2000, WERNER et al., 2003; ZHANG et al., 1995). A auxina, derivada do ápice caulinar, inibe o crescimento de gemas axilares enquanto a citocinina, normalmente derivada das raízes, promove esse crescimento (CLINE, 1991; LEYSER, 2003; SHIMIZU-SATO; MORI, 2001). Quanto maior a dominância apical, menor o crescimento de gemas axilares na parte aérea. Se a dominância apical for alterada, isso vai resultar em crescimento ou inibição das gemas axilares. Para verificar se esse parâmetro é afetado pelo balanço auxina/citocinina, o comprimento das gemas axilares foi medido em plantas cultivadas em casa de vegetação, e quando elas estavam entrando na antese.

Nos genótipos transgênicos (*MT CKX2* e *dgt CKX2*) a quebra na dominância apical foi maior, já que as gemas axilares se desenvolveram mais (Figura 19). O comportamento de *dgt CKX2* foi intermediário entre MT e *MT CKX2* (Figura 16B e 19). O fenótipo de *MT CKX2* não era esperado, já que a diminuição nos níveis endógenos de citocinina levaria a um balanço auxina/citocinina voltado para auxina e, portanto, a dominância apical seria maior e as gemas laterais se desenvolveriam menos. Em *Arabidopsis*, a superexpressão de outros dois membros da família *AtCKX* (*AtCKX1* e *AtCKX3*) também resultou na formação de mais gemas axilares, indicando diminuição na dominância apical, sendo esse efeito oposto ao esperado para plantas com conteúdo diminuído de citocinina (WERNER et al., 2003).

Apesar de *brt* e *MT CKX2* serem ambos citocinina (-), elas diferem completamente no fenótipo. Adicionalmente, o duplo mutante *brt dgt* é menos ramificado ainda que *brt* e *dgt* (Figura 19). Esses fenótipos também não eram esperados, e por isso essa questão mereceria mais investigação. Considerando que o processo de iniciação no desenvolvimento da gema axilar é dependente de diferenciação celular, onde auxinas e citocininas estão envolvidas, sugere-se que a dominância apical é um processo de desenvolvimento controlado pelo balanço auxina/citocinina, e não pelos níveis absolutos de cada um desses hormônios. Isso é coerente com o fato do duplo mutante *dgt CKX2* ter fenótipo intermediário entre *dgt* e *MT CKX2*, tendendo à ramificação normal, semelhante a MT.



Figura 19. Desenvolvimento de gemas laterais em plantas crescidas na casa de vegetação. Plantas superexpressando o gene *AtCKX2* apresentaram gemas laterais bem mais desenvolvidas no início da antese comparadas a plantas não transformadas. Barras de erro representam a média ± SE, n=10.

6.3.3 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço no desenvolvimento reprodutivo

Logo após a trasição do desenvolvimento vegetativo para o reprodutivo, as plantas entram em antese. Exceto em *brt*, o tempo para a antese foi maior nos demais genótipos comparado ao MT, sendo mais acentuado em *MT CKX2* e em *dgt CKX2* (Figura 20A), sugerindo que estes dois últimos genótipo permanecem por mais tempo no estágio vegetativo, o que é confirmado pelo maior número de folhas nessas plantas (Figura 20B). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de *AtCKX1* e *AtCKX3* também resultou no atraso no florescimento, porém isso não ocorreu com linhagens transgênicas *35S:AtCKX2* (WERNER et al., 2003). É possível que em tomateiro, a superexpressão de *AtCKX2* leve a um fenótipo mais severo do que em *Arabidopsis*. Em *brt dgt*, apesar de o tempo para antese também ter sido aumentado em relação a MT (Figura 20A), o número de folhas na antese foi menor que os demais genótipos, o que pode ser atribuído ao seu desenvolvimento lento, já que é uma planta raquítica (Figura 16B). Por isso, o número de folhas na antese nem sempre é um parâmetro que reflete corretamente a precocidade da planta, sendo importante compará-lo com o tempo para antese.

A redução na expressão de *OsCKX2* em arroz resultou no acúmulo de citocinina no meristema da inflorescência e aumentou o número de órgãos reprodutivos (ASHIKARI et al., 2005). Em *Arabidopsis*, reduzidos conteúdos de citocinina pela superexpressão de *AtCKX1* e *AtCKX3* resultou em menor número de flores por inflorescência, porém em plantas

35S:AtCKX2 esse número não foi alterado (WERNER et al., 2003). Esses resultados sugerem que a citocinina promove o aumento no número de flores, tanto em arroz quanto em *Arabidopsis*. Entretanto, em tomateiro foram obtidos resultados opostos, pois a superexpressão de *AtCKX2* resultou em aumento no número de flores por inflorescência, especialmente em *MT CKX2*, que não tem alteração na sensibilidade à auxina, como ocorre em *dgt CKX2* (Figura 20C). Novamente, no duplo mutante *brt dgt*, a redução para esse parâmetro é resultante do seu fenótipo raquítico, já que esses dois mutantes separadamente não diferiram significativamente de MT (Figura 20C).

O tempo para amadurecimento do fruto foi maior em *brt* e em *brt dgt* (Figura 20D). Considerando que em *brt dgt* o desenvolvimento da planta é retardado, o fruto não seria um bom dreno de fotoassimilados. Outro fator que pode ter influenciado o atraso no amadurecimento do fruto é a menor atividade da invertase no mutante *brt* (Item 4.3.4 e Figura 7B). Assim, devido ao menor descarregamento do floema no fruto, resultante da menor atividade da invertase, houve menor desenvolvimento das sementes em *brt* e *brt dgt*, tanto em número (Figura 21A) quanto em peso (Figura 21B).

Os genótipos transgênicos mostraram menor tempo para amadurecimento do fruto (Figura 20D) e, embora tenham menores níveis endógenos de citocinina, o peso das sementes foi maior em relação aos demais genótipos (Figura 21A), o que também foi observado em plantas *35S:CKX2* de *Arabidopsis* (WERNER et al., 2003). O aumento no tamanho das sementes pode ser resultado do aumento no tamanho do embrião (dados não mostrados), que pode ser atribuído ao aumento tanto no número quanto no tamanho das células. No entanto, o aumento no tamanho da semente pode também ser afetado pelo seu tecido materno, como ocorre no mutante *brt* (Item 4.3.2 e Figura 5B). O desenvolvimento reprodutivo (flores e sementes) de plantas deficientes em citocinina indica que esse hormônio controla a atividade do meristema e também limita a formação de células nos órgãos em desenvolvimento durante a fase reprodutiva. Já que o tamanho (mensurado pelo peso) da semente (Figura 21A) foi maior nos genétipos transgênicos, e o tamanho do fruto foi menor (mensurado pelo peso, Figura 22A), então foi consistente o menor número de sementes por fruto em *MT CKX2* e *dgt CKX2* (Figura 21B).

Com exceção do número de sementes por fruto, o qual provavelmente é diretamente afetado pela relação fonte/dreno, em todos os demais parâmetros reprodutivos testados, o duplo mutante *dgt CKX2* mostrou fenótipo similar a MT *CKX2*, o que sugere que eles sejam controlados pelo nível absoluto de citocinina, e não pelo balanço auxina/citocinina.



Figura 20. Traços relacionados ao desenvolvimento reprodutivo. A. Tempo para antese, determinado quanto ao número de dias a partir da semeadura até a abertura da primeira flor. B. Número de folhas, verificado nas plantas no momento da antese. C. Número de flores por inflorescência, verificado na segunda inflorescência de cada planta. D. Tempo para amadurecimento do fruto, determinado quanto ao número de dias a partir da antese até a colheita do primeiro fruto maduro. A-D. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).</p>



Figura 21. Peso de 100 sementes e número de sementes por fruto. A. O peso de 100 sementes foi verificado em sementes que foram retiradas dos frutos e secas em condições de temperatura ambiente ao ar livre durante 2 dias. B. O número de sementes por fruto foi verificado em frutos maduros e bem desenvolvidos.A-B. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).</p>

6.3.4 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço em características agronômicas

Todos os genótipos apresentaram menor peso do fruto (Figura 22A) e menor produção (Figura 22B) em relação a MT, o que poderia ser devido às menores taxas de divisão e expansão celular. O teor de sólidos solúveis totais (TSS), medido em graus brix (Figura 22C) e a acidez total titulável (Figura 22D), foram maiores em todos os genótipos comparados ao MT, sugerindo uma função negativa para a citocinina no acúmulo de TSS e na acidez do fruto. Alternativamente, esses resultados sugerem um efeito de pouca sensibilidade ou deficiência de auxina e citocinina no estabelecimento de drenos. Esse efeito seria direto, ou seja, não seria causado pelo balanço auxina/citocinina, já que os duplos mutantes sempre apresentaram efeito sinergístico.



Figura 22. Traços agronômicos referentes à características do fruto e produção. A. Peso do fruto, verificado em frutos maduros, onde cada repetição consistiu na média do peso dos frutos de uma planta. B. Produção por planta, considerada dentro de um período de 5 meses. C. Brix, verificado em frutos maduros e bem desenvolvidos, utilizando-se um refratômetro digital. D. Acidez total tilulável, verificada utilizando-se a polpa processada de frutos maduros e bem desenvolvidos. A-D. Barras de erro representam a média ± SE, n=10. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).

6.3.5 Impacto da alteração hormonal de auxina e citocinina e seu balanço na morfogênese

Auxinas e citocininas têm sido relacionadas com regeneração *in vitro* desde os primeiros trabalhos de Skoog e Miller (1957). Calos cultivados em meio com alta razão citocinina/auxina normalmente produzem muitas gemas caulinares e poucas raízes, enquanto calos cultivados em meio com baixa razão citocinina/auxina normalmente produzem poucas gemas caulinares e muitas raízes. Concentrações balanceadas entre esses dois hormônios resultam na proliferação de calos indiferenciados (SKOOG; MILLER, 1957). A formação de gemas caulinares e de raízes em explantes cotiledonares foi verificada em meio contendo 5 μ M de BAP e 0.4 μ M de ANA, respectivamente.

A diminuição na sensibilidade à citocinina (mutante *brt*) e à auxina (mutante *dgt*) resultou na diminuição da formação de gemas caulinares *in vitro*, sendo essa resposta também observada no duplo mutante *brt dgt* (Figura 23). No entanto, a diminuição nos níveis endógenos de citocinina (*MT CKX2*) resultou em maior formação de gemas caulinares. Esse resultado foi oposto ao esperado, pois menores níveis de citocinina deveriam resultar em menor formação de gemas caulinares, já que citocinina induz esse processo (SKOOG; MILLER, 1957). Essa resposta observada em *MT CKX2* poderia ser devido à alta habilidade desse genótipo em formar gemas axilares, conforme já discutido no item 6.3.2, o que se estenderia também para o cultivo *in vitro*. Em *dgt CKX2*, a taxa de explantes com gemas foi equivalente à de MT (Figura 23), o que era esperado, já que, nesse genótipo, o balanço auxina/citocinina seria também equivalente ao de MT. Por outro lado, no mutante *dgt*, o balanço estaria voltado para citocinina, e portanto esse genótipo deveria ter regenerado mais, o que não ocorreu (Figura 23). Nesse caso, a mutação em *dgt* pode ter resultado na diminuição da aquisição de competência e, em conseqüência na diminuição da regeneração.

Dentro do modelo proposto por Christianson e Warnick (1988), a organogênese é dividida em diferentes fases. Após a desdiferenciação, as células adquirem competência, a qual é a habilidade para reconhecer estímulos, os quais podem ser hormonais ou não, e se comprometer numa via particular de desenvolvimento. Posteriormente, os sinais induzem um processo que leva as células competentes a alterar seu destino de desenvolvimento (processo de indução). Na diferenciação, ocorre o início da formação de determinados órgãos e os sinais indutivos não são mais necessários.

Algumas respostas observadas até aqui são contrastantes entre o mutante com baixa sensibilidade à citocinina (*brt*) e a planta transgênica com menores níveis endógenos de

citocinina (*MT CKX2*), embora ambos sejam plantas citocinina (-). Mesmo no mutante *dgt* (pouco sensível à auxina), algumas respostas foram diferentes das esperadas. Isso sugere que respostas hormonais de sensibilidade e de níveis endógenos podem ser diferentes, e por isso é importante comparar genótipos com alterações em diferentes vias metabólicas (biossíntese ou degradação) e/ou de sinalização.



Figura 23. Formação de gemas caulinares em explantes cotiledonares cultivados em meio MS contendo 5.0 μM de BAP. A. Porcentagem de explantes que formaram gemas caulinares. Barras de erro representam a média ± SE, n=5. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).B. Representação fotográfica da formação de gemas em explantes cotiledonares dos diferentes genótipos.</p>

Auxinas são relacionadas com a indução na formação de raízes laterais e adventícias (FRIML, 2003; WANG et al., 2005). Com exceção de *brt*, os demais genótipos apresentaram menor taxa de explantes com raízes e de raízes por explante, comparados a MT (Figura 24). Em *dgt*, a menor regeneração pode ser resultante da menor competência e do balanço voltado para citocinina. Em *MT CKX2*, a formação de raízes deveria ter sido maior, já que o balanço está voltado para auxina. Além disso, esse genótipo apresentou raízes bem desenvolvidas *in vivo* (Figura 16A). Esses resultados mostram que a deficiência de citocininas, embora possa

favorecer o crescimento do sistema radicular, como proposto por (WERNER et al., 2003, Fig. 16A), não favorece a iniciação dessas. Situação paralela ocorre com o hormônio auxina, onde é de amplo conhecimento que, embora esse hormônio seja crucial para indução de raízes, ele pode inibir o crescimento posterior das mesmas, já que esses órgãos são especialmente sensíveis à auxina. Uma outra possibilidade seria que, em *MT CKX2*, o balanço voltado para auxina seja supraótimo para indução de raízes. Coerentemente, esse efeito seria corrigido no duplo mutante *dgt CKX2*, o qual tende a restaurar o fenótipo normal, visto em MT, pelo menos para o número de raízes por explante (Figura 24B).

Como já discutido anteriormente, o mutante *brt* e a planta transgênica *MT* CKX2 são plantas citocinina (-), e por isso, esperava-se que as respostas a todos os parâmetros aqui testados fossem parecidas. A tabela 3 resume como cada uma dessas alterações (sensibilidade ou níveis endógenos) altera o desenvolvimento de tomateiro.



Figura 24. Formação de raízes em explantes cotiledonares cultivados em meio MS contendo 0.4 μM de ANA. A. Porcentagem de explantes que formaram raízes. B. Número de raízes formadas em cada explante. C. Representação fotográfica da formação de raízes em explantes cotiledonares dos diferentes genótipos. A-B. Barras de erro representam a média ± SE, n=5. Diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0.01, t de Student).</p>

Tabela 3 –Comparação de características ligadas ao desenvolvimento no mutante brt
(pouca sensibilidade à citocinina) e em plantas transgênicas MT CKX2 (baixos
níveis endógenos de citocinina).

Características	brt	MT CKX2
desenvolvimento das raízes	aumentado	aumentado
área foliar	diminuída	diminuída
dominância apical	normal	diminuída
número de folhas na antese	diminuído	aumentado
tempo para antese	normal	diminuído
número de flores por inflorescência	leve diminuição	aumentado
tempo para maturação do fruto	leve aumento	leve diminuição
peso da semente	diminuído	aumentado
número de sementes por fruto	diminuído	diminuído
peso do fruto	diminuído	diminuído
produção por planta	diminuído	diminuído
brix	aumentado	aumentado
acidez total titulável	aumentado	aumentado
formação de gemas caulinares in vitro	diminuída	aumentada
formação de raízes in vitro	normal	diminuída

6.4 Conclusão

A tabela 4 traz a relação dos traços do desenvolvimento que são afetados pelo nível absoluto de auxina e/ou citocinina e pelo balanço entre essas duas classes hormonais. As respostas relacionadas com divisão e expansão celular seriam controladas pelo efeito absoluto de auxina e/ou citocinina, enquanto as respostas relacionadas à diferenciação celular seriam controladas pelo balanço auxina/citocinina.

 Tabela 4 –
 Traços do desenvolvimento controlados pelos níveis absolutos ou pelo balanço entre auxina e citocinina.

Tipo de controle	Traços
Nível absoluto	desenvolvimento de raízes
	área e perímetro da folha
	número de folhas na antese
	tempo para antese
	número de flores por inflorescência
	peso da semente
	número de sementes por fruto
	peso do fruto e produção
	brix e acidez total titulável
Balanço auxina/citocinina	dominância apical
	morfogênese in vitro

7. CONCLUSÕES FINAIS

A mutação *brt* de tomateiro resulta em diminuição na sensibilidade à citocinina sendo, porém, provavelmente um alvo secundário da ação dessa classe hormonal. A análise de MT*brt* sugere uma importante função da citocinina no desenvolvimento da semente e na determinação da dominância apical em tomateiro.

Os mutantes c e e apresentam respostas sugestivas de alterações em auxina. No entanto, a mutação c não alterou consistentemente a sensibilidade à auxina e estaria influenciando apenas na arquitetura foliar, enquanto o mutante e pareceu ser mais sensível à auxina com relação à capacidade de formar raízes *in vitro* e partenocarpia.

A maior parte dos parâmetros de desenvolvimento avaliados pareceu ser controlada pelos níveis absolutos de auxina e citocinina, estando provavelmente relacionados ao efeito dessas classes hormonais na divisão e expansão celular, enquanto a dominância apical e a morfogênese *in vitro* pareceram ser controladas pelo balanço auxina/citocinina, sendo processos conhecidamente dependente do efeito dessas classes hormonais na diferenciação celular.

REFERÊNCIAS

ABAD, M.; MONTEIRO, A.A. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: a review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 38, p. 167-192, 1989.

ABEL, S.; NGUYEN, M.D.; THEOLOGIS, A. The *PS-IAA4/5*-like family of early auxininducible mRNAs in *Arabidosis thaliana*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 251, p. 533-549, 1995.

ABEL, S.; THEOLOGIS, A. Early genes and auxin action. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 9-17, 1996.

AINLEY, W.; KEY, J. Regulatable endogenous production of cytokinins up to 'toxic' levels ins transgenic plants and plant tissues. **Plant and Molecular Biology**, Heidelberg, v. 22, p. 13-23, 1993.

AKIYOSHI, D.; KLEE, H.; AMASINO, R.; NESTER, E.; GORDON, M. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 81, p. 5994-5998, 1984.

AKIYOSHI, D.E.; REGIER, D.A.; GORDON, M.P. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 169, p. 4242-4248, 1987.

ALABADÍ, D.; AGÜERO, M.S.; PÉREZ-AMADOR, M.A.; CARBONELL, J. Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries. Changes in pollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 1237-1244, 1996.

ALABADÍ, D.; CARBONELL, J. Expression of ornithine decarboxylase in transiently increased by pollination, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, and gibberellic acid in tomato ovaries. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, p. 323-328, 1998.

ALBA, R.; PAYTON, P.; FEI, Z.; MCQUINN, R.; DEBBIE, P.; MARTIN, G.B.; TANKSLEY, S.D.; GIOVANNONI, J.J. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 2954-2965, 2005.

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.

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

BALBI, V.; LOMAX, T.L. Regulation of early tomato fruit development by the *Diageotropica* gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 186-197, 2003.

BARTEL, B.; FINK, G.R. IRL1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. **Science**, Washington, v. 268, p. 1745-1748, 1995.

BASSEL, G.W.; MULLEN, R.T.; BEWLEY, J.D. *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. Journal of Experimental Botany, Oxford, v. 59, p. 585-593, 2008.

BENNETT, M.J.; MARCHANT, A.; GREEN, H.G.; MAY, S.T.; WARD, S.P.; MILLNER, P.A.; WALKER, A.R.; SCHULZ, B.; FELDMANN, K.A. *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. **Science**, Washington, v. 273, p. 948-959, 1996.

BENNETT, S.R.M.; ALVAREZ, J.; BOSSINGER, G.; SMYTH, D.R. Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 505-520, 1995.

BENSEN, R.J.; ZEEVAART, J.A.D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. Journal of Plant Growth Regululation, New York, v. 9, p. 237-242, 1990.

BERLETH, T.; SACHS, T. Plant morphogenesis: Long-distance coordination and local patterning. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 57–62, 2001.

BLATT, M.R.; THIEL, G. K^+ channels of stomatal guard cells: bimodal control of the K+ inward-rectifier evoked by auxin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 5, p. 55–68, 1994.

BLILOU, I.; XU, J.; WILDWATER, M.; WILLEMSEN, V.; PAPONOV, I.; FRIML, J.; HEIDSTRA, R.; AIDA, M.; PALME, K.; SCHERES, B. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. **Nature,** London, v. 433, p. 39-44, 2005.

BOERJAN, W.; CERVERA, M.T.; DELARUE, M.; BEECKMAN, T.; DEWITTE, W.; BELLINI, C.; CABOCHE, M.; ONCKELEN, H.V.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1405-1419, 1995.

BOOKER, J.; CHATFIELD, S.; LEYSER, O. Auxin Acts in Xylem-Associated or Medullary Cells to Mediate Apical Dominance. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 495-507, 2003.

BRAMLEY, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 2107-2113, 2002.

BRANDSTATTER, I.; KIEBER, J.J. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p.1009-1020, 1998.

BROWN, K.M. Ethylene and abscission. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 100, p. 567-576, 1997.

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 Jornal**, Oxford, v. 17, p. 427-431, 1999.

CAPLIN, S.M.; STEWARD, F.C. Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. **Science**, Washington, v. 108, p. 655-657, 1948.

CARLAND, F.; BERG, B.; FITZGERALD, J.N.; JINAMORNPHONGS, S.; NELSON, T.; KEITH, B. Genetic regulation of vascular tissue patterning in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 2123-2137, 1999.

CARRARI, F.; BAXTER, C.; USADEL, B.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; ZANOR, M.I.; NUNES-NESI, A.; NIKIFOROVA, V.; CENTERO, D.; RATZKA, A.; PAULY, M.; SWEETLOVE, L.J.; FERNIE, A.R. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit developmental and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 1380-1396, 2006.

CARVALHO, R.F. **Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento.** 2007. 106f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CARY, A.J.; LIU, W.; HOWELL, S.H. 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.

CARY, A.J.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A., HOWELL, S.H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 700-707, 2001.

CASIMIRO, I.; MARCHANT, A.; BHALERAO, R.P.; BEECKMAN, T.; DHOOGE, S.; SWARUP, R.; GRAHAM, N.; INZÉ, D.; SANDBERG, G.; CASERO, P.J.; BENNET, M. Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 843–852, 2001.

CATTEROU, M.; DUBOIS, F.; SMETS, R.; VANIET, S.; KICHEY, T.; VAN ONCKELEN, H.; SANGWAN-NORREEL, B.S.; SANGWAN, R.S. *hoc*: an Arabidopsis mutant overproducing cytokinins and expressing high in vitro organogenic capacity. **The Plant Journal**, Oxford, v. 30, p. 273-287, 2002.

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 photomorphogenesisw and precocious flowering. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 907-916, 1993.

CHEN, C.-M.; JIN, G.; ANDERSON, B.R.; ERTL, J. Modulation of plant gene expression by cytokinins. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 20, p. 609-619, 1993.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças**: fisiologia e manuseio. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.

CHOLODNY, N. Beiträge zur Analyse der geotropischen Reaktion. Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik, Berlin, v. 65, p. 447–459, 1926.

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.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **HortScience**, St. Joseph, v. 23, p. 515-519, 1988.

CHUCK, G.; LINCOLN, C.; HAKE, S. KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1277–1289, 1996.

CLINE, M.G. Apical dominance. Botanical Review, Lancaster, v. 57, p. 318-358, 1991.

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.

COLLETT, 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.

CROWELL, D.N.; AMASINO, R.M. Cytokinins and plant gene regulation. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.). **Cytokinins**: chemistry, activity and function. Boca Raton: CRC Press, 1994. p 233-242.

D'AGOSTINO, I.B.; DERUÈRE, J.; KIEBER, J.J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, p. 1706-1717, 2000.

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

DAVIES, C.; BOSS, P.K.; ROBINSON, S.P. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 1155-1161, 1997.

DAVIES, P.J. **Plant hormones**: physiology, biochemistry and molecular biology. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833 p.

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

DEIKMAN, J.; ULRICH, M. A novel cytokinin resistant mutant of Arabidopsis with abbreviated shoot development. **Planta**, Berlin, v. 195, p. 440-449, 1995.

DEL POZO, J.C.; ESTELLE, M. Function of the ubiquitin-proteosome pathway in auxin response. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 107-112, 1999.

DEL POZO, J.C.; TIMPTE, C.; TAN, S.; CALLIS, J.; ESTELLE, M. The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 280, p. 1760-1763, 1998.

DELLO IOIO, R.; LINHARES, F.S.; SCACCHI, E.; CASAMITJANA-MARTINEZ, E.; HEIDSTRA, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. Cytokinins determine Arabidopsis rootmeristem size by controlling cell differentiation. **Current Biology**, London, v. 17, p. 678–682, 2007.

DENGLER, N.; KANG, J. Vascular patterning and leaf shape. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 4, p. 50-56, 2001.

DENGLER, N.G. Comparison of leaf development in normal (+/+), *entire* (*e/e*), and *Lanceolate* (*La*/+) plants of tomato, Lycopersicon esculentum "Ailsa Craig". **Botanical Gazette**, Chicago, v. 145, p. 66-77, 1984.

DE VICENTE, M.C.; TANKSLEY, S.D. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. **Genetics**, Bethesda, v. 134, p. 585-596, 1993.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; ESTELLE, M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature**, London, v. 435, p. 441-445, 2005.

DHARMASIRI, N.; DHARMASIRI, S.; JONES, A.M.; ESTELLE, M. Auxin action in a cell-free system. **Current Biology**, London, v. 13, p. 1418-1422, 2003.

DUBROVSKY, J.G.; SAUER, M.; NAPSUCIALY-MENDIVIL, S.; IVANCHENKO, M.G.; FRIML, J.; SHISHKOVA, S.; CELENZA, J.; BENKOVÁ, E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. **Proceedings of the National** Academy of Sciences of the USA, Washington, v. 105, p. 8790-8794, 2008.

EKLÖF, S.; ÅSTOT, C.; BLACKWELL, J.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Cytokinin metabolites and gradients in wild type and transgenic tobacco with moderate cytokinin overproducing. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 98, p. 333-344, 1996.

EKLÖF, S.; ÅSTOT, C.; BLACKWELL, J.; MORITZ, T.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 38, p. 225-235, 1997.

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-overproducing phenotypes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, p. 279-284, 2000.

ELLIS, C.M.; NAGPAL, P.; YOUNG, J.C.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J.; REED, J.W. *AUXIN RESPONSE FACTOR1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. **Development**, Washington, v. 132, p. 4563-4574, 2005.

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

ESTRUCH, J.J.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H.; SCHELL, J.; SPENA, A. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. **Science**, Washington, v. 254, p. 1364-1367, 1991.

EVANS, M.L. The action of auxin on plant cell elongation. Critical Reviews in Plant Science, Boca Raton, v. 2, p. 317-365, 1985.

FAURE, J.-D.; HOWELL, S.H. Cytokinin perception and signal transduction. In: HOOYKAAS, P.J.J.; HALL, M.A.; LIBBENGA, K.R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plant hormones**. Amsterdam: Elsevier Science, 1999. p. 461-474.

FELLE, H.; PETERS, W.; PALME, K. The electrical response of maize to auxins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1064, p. 199-204, 1991.

FERREIRA, F.J.; KIEBER, J.J. Cytokinin signalling. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 8, p. 518-525, 2005.

FOS, M.; NUEZ, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L.; The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellins content in unpollinated tomato ovaries. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 471-479, 2000.

FOS, M.; PROAÑO, K.; NUEZ, F.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 111, p. 545-550, 2001.

FRARY, A.; NESBITT, T.C.; FRARY, A.; GRANDILLO, S.; VAN DER KNAAP, E.; CONG, B.; LIU, J.; MELLER, J.; ELBER, R.; ALPERT, K.B.; TANKSLEY, S.D. *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, Washington, v. 289, p. 85-88, 2000.

FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ-CASTINEIRA, J.R.; NAVARRO-AVINO, J.P.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, H.; PAGES, M.; HAGER, A.; SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H+-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1533-1544, 1996.

FRILM, J. Auxin transport – Shaping the plant. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, p. 7-12, 2003.

FRIML, J.; WISNIEWSKA, J.; BENKOVA, E.; MENDGEN, K.; PALME, K. Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 415, p. 806-809, 2002.

FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H.; HAMANN, T.; OFFRINGA, R.; JÜRGENS, G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 426, p. 147-153, 2003.

FRUGIS, G.; GIANNINO, D.; MELE, G.; NICOLODI, C.; CHIAPPETTA, A.; BITONTI, M.B.; INNOCENTI, A.M.; DEWITTE, W.; VAN ONCKELEN, H.; MARIOTTI, D. Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like

indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins. **Plant Physiology**, Rickville, v. 126, p. 1370-1380, 2001.

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, 1988a.

FUJINO, D.W.; NISSEN, S.J.; JONES, A.D.; BUERGER, D.W.; BRADFORD, K.L. Quantification of indole-3-acetic acid in dark-growth seedlings of diageotropica and epinastic mutants of tomato (Lycopersicon esculentum Mill). **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 780-784, 1988b.

FUKAKI, H.; TAMEDA, S.; MASUDA, H.; TASAKA, M. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 153-168, 2002.

GÄLWEILER, L.; GUAN, C.; MÜLLER, A.; WISMAN, E.; MENDGEN, K.; YEPHREMOV, A.; PALME, K.; Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. **Science**, Washington, v. 282, p. 2226-2230, 1998.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

GAN, S. The hormonal regulation of senescence. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones**: biosynthesis, signal transduction, action. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. p. 561-581.

GAN, S.; AMASINO, R.M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. **Science**, Washington, v. 270, p. 1986-1988, 1995.

GAN, S.; AMASINO, R. Cytokinins in plant senescence: from spay and pray to clone and play. **Bioessays**, Cambridge, v. 18, p. 557-565, 1996.

GILLASPY, G.; BEN-DAVID, H.; GRUISSEM, W. Fruits: a developmental perspective. **The Plant Cell**, Bartimore, v. 5, p. 1439-1451, 1993.

GIOVANNONI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. S170-S180, 2004.

GIOVANNONI, J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 10, p. 283-289, 2007.

GRAY, W.M.; KEPINSKI, S.; ROUSE, D.; LEYSER, O.; ESTELLE, M. Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. **Nature**, London, v. 414, p. 271–276, 2001.

GRAY, W.M.; DEL POZO, J.C.; WALKER, L.; HOBBIE, L.; RISSEEUW, E.; BANKS, T.; CROSBY, W.L.; YANG, M.; MA, H.; ESTELLE, M. Identification of an SCF ubiquitinligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. Genes & Development, New York, v. 13, p. 1678-1691, 1999. GRAY, W.M.; ÖSTIN, A.; SANDBERG, G.; ROMANO, C.P.; ESTELLE, M. High temperature promotes auxin-mediated hypocotyls elongation in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 95, p. 7197-7202, 1998.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Rapid induction of selective transcription by auxins. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 5, p. 1197-1203, 1985.

HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; PARNIS, A.; ESHED, Y.; LIFSCHITZ, E. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. **Cell**, New York, v. 84, p. 735-744, 1996.

HASS, C.; LOHRMANN, J.; ALBRECHT, V.; SWEERE, U.; HUMMEL, F.; YOO, S.D.; HWANG, I.; ZHU, T.; SCHÄFER, E.; KUDLA, J.; HARTER, K. The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 23, p. 3290-3302, 2004.

HAY, A.; BARKOULAS, M.; TSIANTIS, M. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress BREVIPEDICELLUS expression and promote leaf development in Arabidopsis. **Development**, Washington, v. 133, p. 3955-3961, 2006.

HELLIWELL, C.A.; CHIN-ATKINS, A.N.; WILSON, I.W.; CHAPPLE, R.; DENNIS, E.S.; CHAUDHURY, A. The Arabidopsis *AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 2115-2125, 2001.

HEYL, A.; SCHMÜLLING, T. Cytokinin signal perception and transduction. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 6, p. 480-488, 2003.

HOBBIE, L.J. Auxin: molecular genetic approaches in Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 36, p. 91–102, 1998.

HOBBIE, L.; ESTELLE, M. Genetic approaches to auxin action. Plant, Cell and Environment, Oxford, v. 17, p. 525-540, 1994.

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

HWANG, I.; SHEEN, J. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. **Nature**, London, v. 413, p. 383-389, 2001.

IMAMURA, A.; HANAKI, N.; NAKAMURA, A.; SUZUKI, T.; TANIGUCHI, M.; KIBA, T.; UEGUCHI, C.; SUGIYAMA, T.; MIZUNO, T. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 40, p. 733-742, 1999.

INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 409, p. 1060-1063, 2001.

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

JACKSON, D.; VELT, B.; HAKE, S. Expression of maize *knotted*1-related homeobox genes in the shoot apical meristem predictis patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. **Development**, Cambridge, v. 120, p. 405-413, 1994.

JONES, R.J.; SCHREIBER, B.M.N. Role and function of cytokinin oxidases in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 23, p. 122-134, 1997.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

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

KEPINSKI, S.; LEYSER, O. Auxin-induced SCFTIR1–Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 12381-12386, 2004.

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

KERSTETTER, R.A.; HAKE, S. Shoot meristem formation in vegetative development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1001-1010, 1997.

KESSLER, S.; KIM, M.; PHAM, T.; WEBER, N.; SINHA, N. Mutations altering leaf morphology in tomato. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 162, p. 475-492, 2001.

KEY, J.L.; BARNETT, N.M.; LIN, C.Y. RNA and protein biosynthesis and the regulation of cell elongation by auxin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 144, p. 49-62, 1967.

KIEBER, J.J. Cytokinins. In: SOMERVILLE, C.; MEYEROWITZ, E. (Ed.). **The Arabidopsis book**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2002. Disponível em: <u>http://www.aspb.org/publications/arabidopsis</u>. Acesso em: 22 abr. 2009.

KLEE, H.J.; HORSCH, R.B.; HINCHEE, M.A.; HEIN, M.B.; HOFFMAN, N.L. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. **Genes & Development**, New York, v. 1, p. 86-96, 1987.

KLEE, H.; ESTELLE, M. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 42, p. 529-551, 1991.

KLEE, H. Transgenic plants and cytokinin biology. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.). **Cytokinins**: chemistry, activity and function. Boca Raton: CRC Press, 1994. p 289-293.

KOIZUME, K.; NARAMOTO, S.; SAWA, S.; YAHARA, N.; UEDA, T.; NAKANO, A.; SUGIYAMA, M.; FUKUDA, H. VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. **Development**, Washington, v. 132, p. 1699-1711, 2005.

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

KOORNNEEF, M. Classical mutagenesis in higher plants. In: GILMARTIN, P.M.; BOWLER, C. (Ed.). **Molecular plant.** Biology SET. Oxford: Oxford University Press, 2002. p 1-11.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, 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.; JORNA, M.L.; BRINKHORST-VAN DER SWAN, D.L.C.; KARSSEN, C.M. The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 61, p. 385-393, 1982.

KOORNNEEF, M.; REULING, G.; KARSSEN, C.M. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 61, p. 377-383, 1984.

KOSHIOKA, M.; NISHIJIMA, T.; YAMAZAKI, H.; LIU, Y.; NONAKA, M.; MANDER, L.N. Analysis of gibberellins in growing fruits of Lycopersicon esculentum after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. **The Journal of Horticultural Science**, London, v. 69, p. 171-179, 1994.

KRANZ, H.D.; DENKAMP, M.; GRECO, R.; JIN, H.; LEYVA, A; MEISSNER, R.C.; PETRONI, K.; URZAINQUI, A.; BEVAN, M.; MARTIN, C.; SMEEKENS, S.; TONELLI, C.; PAZ-ARES, J.; WEISSHAAR, B. Towards functional characterization of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, p. 263-276, 1998.

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

LARA, M.E.B.; GARCIA, M.-C.G.; FATIMA, T.; EHNEB, R.; LEE, T.K.; PROELS, R.; TANNER, W.; ROITSCH, T. Extracellular invertases is an essential component of cytokininmediated delay of senescence. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 1276-1287, 2004.

LAXMI, A.; PAUL, L.K.; RAYCHAUDHURI, A.; PETERS, J.L.; KHURANA, J.P. Arabidopsis cytokinin-resistant mutant, cnr1, displays altered auxin responses and sugar sensitivity. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, p. 409-425, 2006.
LENHARD, M.; JÜRGENS, G.; LAUX, T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfill complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. **Development**, Cambridge, v. 129, p. 3195-3206, 2002.

LENTON, J.R. Are plant growth substances involved in the partitioning of assimilate to developing reproductive sinks? **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 2, p. 267-276, 1984.

LETHAM, D.S. Cytokinins from Zea mays. **Phytochemistry**, Oxford, v. 12, p. 2445-2455, 1973.

LETHAM, D.S.; PALNI, L.M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 34, p. 163-197, 1983.

LEYSER, H.M.; LINCOLN, C.A.; TIMPTE, C.; LAMMER, D.; TURNER, J.; ESTELLE, M. *Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **Nature**, London, v. 364, p. 161-164, 1993.

LEYSER, O. Regulation of shoot branching by auxin. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 8, p. 541-545, 2003.

LEWIS, D.H.; BURGE, G.K.; HOPPING, M.E.; JAMESON, P.E. Cytokinins and fruit development in the kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). II. Effects of reduced pollination and CPPU application. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 98, p. 187-195, 1996.

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

LI, Y.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. **Developmental Biology**, New York, v. 153, p. 386-395, 1992.

LICHTENHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIM, P.O.; KIM, H.J.; NAM, H.G. Leaf senescence. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 58, p. 115-136, 2007.

LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Callus, shoot and hairy root formation *in vitro* as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. **Plant Cell Reports**, 2009. DOI 10.1007/s00299-009-0718-y. Disponível em: <u>http://www.springerlink.com/content/m3501px540u4623g/fulltext.pdf</u>. Acesso em: 01 jun. 2009.

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.

LJUNG, K.; HULL, A.K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J.D.; SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, p. 249-272, 2002.

LJUNG, K.; HULL, A.K.; CELENZA, J.; YAMADA, M.; ESTELLE, M.; NORMANLY, J.; SANDBERG, G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 1090-1104, 2005.

LJUNG, K.; BHALERAO, R.P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 465-474, 2001.

LOMAX, T.L.; COENEN, C.; GAISER, J.C.; HOPKINS, R.; RAYLE, D.L.; RICE, M.L. Auxin perception and the regulation of tomato growth and development. In: YODER, J.I. (Ed.). **Molecular biology of tomato**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1993. p. 129-138.

LUSCHNIG, C.; GAXIOLA, R.A.; GRISAFI, P.; FINK, G.R. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. **Genes and Development**, New York, v. 12, p. 2175-2187, 1998.

MANNING, K. Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. **Planta**, Berlin, v. 194, p. 62–68, 1994.

MAO, L.; BEGUM, D.; CHUANG, H.; BUDIMAN, M.A.; SZYMKOWIAK, E.J.; IRISH, E.E.; WING, R.A. JOINTLESS is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. **Nature**, London, v. 406, p. 910–913, 2000.

MARCHANT, A.; KARGUL, J.; MAY, S.T.; MULLER, P.; DELBARRE, A.; PERROT-RECHENMANN, C.; BENNETT, M.J. AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 18, p. 2066-2073, 1999.

MARTIN, R.C.; MOK, M.C.; HABBEN, J.E.; MOK, D.W.S. A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 5922-5926, 2001.

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**, Oxford, v. 13, p. 250-254, 1995.

MASON, M.G.; MATHEWS, D.E.; ARGYROS, D.A.; MAXWELL, B.B.; KIEBER, J.J.; ALONSO, J.M.; ECKER, J.R.; SCHALLER, G.E. Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 3007-3018, 2005.

MASSOM, P.H.; TASAKA, M.; MORITA, M.T.; GUAN, C.; CHEN, R.; BOONSIRICHAI, K. *Arabidopsis thaliana*: a model for the study of root and shoot gravitropism. In: SOMERVILLE, C.; MEYEROWITZ, E. (Ed.). **The Arabidopsis book**. Rockville: American

Society of Plant Biologists, 2002. Disponível em: http://www.aspb.org/publications/arabidopsis. Acesso em: 27 abr. 2009.

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.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; KABAYASHI, Y.; YIN, Y.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (Solanum lycopersicum L.) cultivar 'Micro-Tom'. **Plant Biotechnology**, Dorbrecht, v. 24, p. 39-44, 2007.

MATTSSON, J.; SUNG, Z.R.; BERLETH, T. Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. **Development**, Cambridge, v. 126, p. 2979-2991, 1999.

MCCLURE, B.A.; GUILFOYLE, T.J. Characterisation of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 9, p. 611-623, 1987.

MCKENZIE, M.J.; METT, V.; REYNOLDS, P.H.S.; JAMESON, P.E. Controlled cytokinin production in transgenic tobacco using a copper-inducible promoter. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 969–977, 1998.

MEDFORD, J.; HORGAN, R.; EL-SAWI, Z.; KLEE, H. Alterations of endogenous cytokinin in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 403-413, 1989.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, Y.; 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. 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.

MILLER, C.O.; SKOOG, F.; OKOMURA, F.S.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F.M. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. Journal of the American Chemical Society, Easton, v. 78, 1345-1350, 1956.

MILLER, C.O.; SKOOG, F.; VON SALTZA, M.H.; STRONG, F. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 77, p. 1392-1293, 1955.

MIRON, D.; SCHAFFER, A.A. Sucrose phosphate syntase, sucrose syntase, and invertase activites in developing fruit of Lycopersicon esculentum Mill. and the sucrose accumulating

Lycopersicon hirstum Humb. and Bonpl. Plant Physiology, Rockville, v. 95, p. 623-627, 1991.

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

MOK, M.C. Cytokinin and plant development – An overview. In: MOK, D.W.S.; MOK, M.C. (Ed.). **Cytokinins**: chemistry, activity and function. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 155-166.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, Palo Alto, v. 52, p. 89-118, 2001.

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.

MOTIKA, V.; KAMINCK, M. In: KAMINCK, M.; MOK, D.W.S.; ZAZIMALOVA, E. (Ed.). **Physiology and biochemistry of cytokinins in plants**. The Hague: Academic Publishers, 1992. p. 33-39.

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

MULLER, B.; SHEEN, J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. **Nature**, London, v. 453, p. 1094-1097, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-479, 1962.

NAGPAL, P.; WALKER, L.M.; YOUNG, J.C.; SONAWALA, A.; TIMPTE, C.; ESTELLE, M.; REED, J.W. *AXR2* encodes a member of the Aux/IAA protein family. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 563-573, 2000.

NANDAGOPAL, S.; RANJITHA KUMARI, B.D. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, Plovdiv, v. 8, p. 73-80, 2007.

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

NEMHAUSER, J.L.; FELDMAN, L.J.; ZAMBRYSKI, P.C. Auxin and ETTIN in Arabidopsis gynoecium morphogenesis. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 3877-3888, 2000.

NOH, B.; BANDYOPADHYAY, A.; PEER, W.A.; SPALDING, E.P.; MURPHY, A.S. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. **Nature**, London, v. 423, p. 999-1002, 2003.

NOH, B.; MURPHY, A.S.; SPALDING, E.P. *Multidrug resistance*-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 2441-2454, 2001.

NORDSTRÖM, A., TARKOWSKI, P., TARKOWSKA, D., NORBAEK, R., ASTOT, C., DOLEZAL, K., AND SANDBERG, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 8039-8044, 2004.

OH, K.; IVANCHENKO, M.G.; WHITE, T.J. The *diageotropica* gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signalling. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 133-144, 2005.

OHYAMA, A.; ITO, H.; SATO, T.; NISHIMURA, S.; IMAI, T.; HIRAI, M. Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 36, p. 369–376, 1995.

OKADA, K.; UEDA, J.; KOMAKI, M.K.; BELL, C.J.; SHIMURA, Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 677-684, 1991.

ONDREJ, M.; BAVRINA, T.V.; DUDKO, N.; HROUDA, M.; KREKULE, J.; LOZHNIVKOVA, V.N.; MACHAKOVA, I.; SEIDLOVA, F.; VLASAK, J. Transgenic tobacco plants with T-DNA phytohormone synthesis genes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 33, p. 40-48, 1991.

OVERVOORDE, P.J.; OKUSHIMA, Y.; ALONSO, J.M.; CHAN, A.; CHANG, C. ECKER, J.R.; HUGHES, B.; LIU, A.; ONODERA, C.; QUACH, H.; SMITH, A.; YU, G.; THEOLOGIS, A. Functional genomic analysis of the *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* gene family members in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 3282–3300, 2005.

PALNI, L.M.S.; BURCH, L.; HORGAN, R. The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism, **Planta**, Berlin, v. 174, p. 231-234, 1988.

PANDOLFINI, T.; ROTINO, G.L.; CAMERINI, S.; DEFEZ, R.; SPENA, A. Optimisation of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. **BMC Biotechnology**, Tempe, v. 2, p. 1-11, 2002.

PAPONOV, I.A.; TEALE, W.D.; TREBAR, M.; BLILOU, K.; PALME, K. The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, p. 170-177, 2005.

PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation. Journal of Plant **Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1253-1257, 2003.

PATRICK, J.W. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 191-222, 1997.

PEDLEY, K.F.; MARTIN, G.B. Molecular basis of Pro-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 215-243, 2003.

PERES, L.E.P.; CARVALHO, R.F.; ZSÖGÖN, A.; BERMÚDEZ-ZAMBRANO, O.D.; ROBLES, W.G.R.; TAVARES, T. 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.

PERNISOVÁ, M.; KLIMA, P.; HORÁK, J.; VÁLKOVÁ, M.; MALBECK, J.; SOUČEK, P.; REICHMAN, P.; HOYEROVÁ, K.; DUBOVÁ, J.; FRIML, J.; ZAŽÍMALOVÁ, E.; HEJÁTKO, J. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 3609-3614, 2009.

PERTRY, I.; VÁCLAVÍKOVÁ, K.; DEPUYDT, S.; GALUSZKA, P.; SPÍCHAL, L.; TEMMERMAN, W.; STES, E.; SCHMÜLLING, T.; KAKIMOTO, T.; VAN MONTAGU, M.C.E.; STRNAD, M.; HOLSTERS, M.; TARKOWSKI, P.; VEREECKE, D. Identification of Rhodococcus fascians cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, p. 929-934, 2008.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002–2007, 2001.

PHILLIPS, I. Apical dominance. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, v. 26, p. 3341-3367, 1975.

PILET, P.E.; SAUGY, M. Effect of root growth of endogenous and applied AIA and ABA. A critical reexamination. **Plant Physiology**, Rockville, v. 83, p. 33-38, 1987.

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. 73f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PINO-NUNES, L.E.; FIGUEIRA, A.V.O.; TULMANN NETO, A.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F.A.; SILVA, J.A.; BERNARDI, W.F.; PERES, L.E.P. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 821, p. 63-72, 2009.

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.

QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 172-175, 2007.

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

REINHARDT, D.; PESCE, E-V; STIEGER, P.; MANDEL, T.; BALTENSPERGER, K.; BENNETT, M.; TRAAS, J.; FRIML, J.; KUHLEMEIER, C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. **Nature**, London, v. 426, p. 255-260, 2003.

REMINGTON, D.L.; VISION, T.J.; GUILFOYLE, T.J.; REED, J.W. Contrasting modes of diversification in the *Aux/IAA* and *ARF* gene families. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 1738-1752, 2004.

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

RICK, C.M.; BUTLER, L. Cytogenetics of tomato. Advances in Genetics, San Diego, v. 8, p. 267-382, 1956.

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

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMULLING, 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.

ROITSCH, T.; EHNEB, R. Regulation of source/sink relations by cytokinins. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, p. 359-367, 2000.

ROSIER; C.L.; FRAMPTON, J.; GOLDFARB, B.; BLAZICH, F.A.; WISE, F.C. Growth stage, auxin type and concentration influence rooting of stem cuttings of Fraser fir. **HortScience**, St. Joseph, v. 39, p. 1397-1402, 2004.

ROSINSKI, J.; ATCHLEY, W. Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: Evidence for polyphyletic origin. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 46, p. 74-83, 1988.

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

RÜCK, A.; PALME, K.; VENIS, M.A.; NAPIER, R.M.; FELLE, R.H. Patch-clamp analysis establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of plasma membrane current in *Zea mays* protoplasts. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 41-46, 1993.

RUEGGER, M.; DEWEY, E.; HOBBIE, L.; BROWN, D.; BERNASCONI, P.; TURNER, J.; MUDAY, G.; ESTELLE, M. Reduced Naphthylphthalamic Acid Binding in the *ti13* Mutant of Arabidopsis 1s Associated with a Reduction in Polar Auxin Transport and Diverse Morphological Defects. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 745-757, 1997.

RUPP, H.-M.; FRANK, M.; WERNER, T.; STRNARD, 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.

SACKS, E.J.; GERHARDT, L.M.; GRAHAM, E.B.; JACOBS, J.; THORRUP, T.A.; CLAIR, D.A.ST. Variation among 41 genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crossability to *L. peruvianum* (*L.*) Mill. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p. 469–477, 1997.

SACHS, T. Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 41, p. 649-656, 2000.

SAKAKIBARA, H.; KASAHARA, H.; UEDA, N.; KOJIMA, M.; TAKEI, K.; HISHIYAMA, S.; ASAMI, T.; OKADA, K.; KAMIYA, Y.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, S. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 9972-9977, 2005.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 47-249, 1973.

SAKAI, H.; HONMA, T.; AOYAMA, T.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S.; OKA, A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. **Science**, Washington, v. 294, p. 1519-1521, 2001.

SALISBURY, F.B. The dual role of auxin in flowering. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, p. 327-334, 1955.

SALMERON, J.M.; OLDROYD, G.; ROMMENS, C.; SCOFIELD, S.R.; KIM, H.-S.; LAVELLE, D.T.; DAHLBECK, D.; STASKAWICZ, B.J. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. **Cell**, New York, v. 86, p. 123-133, 1996.

SANTONI, V.; DELARUE, M.; CABOCHE, M.; BELLINI, C. A comparison of twodimensional electrophoresis data with phenotypical traits in Arabidopsis leads to the identification of a mutant (*cri1*) that accumulates cytokinins. **Planta**, Berlin, v. 202, p. 62-69, 1997.

SCHAFFER, A.; PETREIKOV, M.; MIRON, D.; FOGELMAN, M.; SPIEGELMAN, M.; BNEI-MOSHE, Z.; SHEN, S.; GRANOT, D.; HADAS, R.; DAI, N.; LEVINE, I.; BAR, M.; FRIEDMAN, M.; PILOWSKY, M.; GILBOA, N.; CHEN, L. Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit (colloquium paper). **HortScience**, St. Joseph, v. 34, p. 12-15, 1999.

SCHMITZ, G.; TILLMANN, E.; CARRIERO, F.; FIORE, C.; CELLINI, F.; THERES, K. The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. **Proceeding of the National Academy of science of the USA**, Washington, v. 99, p. 1064-1069, 2002.

SCHMÜLLING, T. Cytokinin. In: LENNARZ, W., LANE, M.D. (Ed.). Encyclopedia of Biological Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2004. p. 562-567.

SCHMÜLLING, T.; BEINSBERGER, S.; DE GREEF, J.; SCHELL, J.; VAN ONCKELEN, H.; SPENA, A. Construction of a heat inducible chimaeric gene to increase the cytokinin content in transgenic plant tissue. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 401-406, 1989.

SCHUMACHER, K.; SCHMITT, T.; ROSSBERG, M.; SCHMITZ, G.; THERES, K. The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 290-295, 1999.

SERRANI, J.C.; FOS, M.; ATARÉS, A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv Micro-Tom of tomato. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, p. 211-221, 2007.

SHIMIZU-SATO, S.; MORI, H. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1405-1413, 2001.

SHIN, R.; BURCH, A.Y.; HUPPERT, K.A.; TIWARI, S.B.; MURPHY, A.S.; GUILFOYLE, T.J. The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 2440-2453, 2007.

SITBON, F.; HENNION, S.; SUNDBERG, B.; LITTLE, C.H.A.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Transgenic tobacco plants coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens iaaM* and *iaaH* genes display altered growth and indole-3-acetic acid metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1062-1069, 1992.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-130, 1957.

SMART, C.; SCOFIELD, S.; BEVAN, M.; DYER, T. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with tmr, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 647-656, 1991.

SMIGOCKI, A. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 16, p. 105-115, 1991.

SMIGOCKI, A.; OWENS, L. Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 85, p. 5131-5135, 1988.

SMIGOCKI, A.C.; OWENS, L.D. Cytokinin-to-auxin ratios and morphology of shoots and tissues transformed by a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 808-811, 1989.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, v. 160, p. 61-63, 1945.

STEFANCIC, M.; STAMPAR, F.; OSTERC, G. Influence of endogenous IAA levels and exogenous IBA on rooting and quality of leafy cuttings of *Prunus* 'GiSelA 5'. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, Ashford, v. 81, p. 508-512, 2006.

STEVENS, A.M., RICK, C.M. Genetics and breeding. In: ATHERTON, J.G.; RUDICK, J. (Ed.). **The tomato crop**: a scientific basis for improvement. New York: Chapman and Hall, 1986. p. 35-109.

STIRK, W.A.; ÖRDÖG, V.; STADEN, J. Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of Arthronema africanum (cyanobacteria). **Journal of Phycology**, Baltimore, v. 35, p. 89-92, 1999.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 447–456, 2001.

STURM, A.; TANG, G-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 401-407, 1999.

SU, W.; HOWELL, S.H. A single genetic locus, *ckr1*, defines Arabidopsis mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 1569-1574, 1992.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, San Francisco, v. 47, p. 426-431, 2006.

SUTTLE, J.C.; HULTSTRAND, J.F. Ethylene-induced leaf abscission in cotton seedlings: the physiological bases for age-dependent differences in sensitivity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 29-33, 1991.

SUZUKI, T.; SAKURAI, K.; UEGUCHI, C.; MIZUNO, T. Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 42, p. 37-45, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; SYGIYAMA, T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. Journal of **Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, p. 26405-26410, 2001.

TANAKA, M.; TAKEI, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; MORI, H. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 1028-1036, 2006.

TANIGUCHI, M.; KIBA, T.; SAKAKIBARA, H.; UEGUCHI, C.; MIZUNO, T.; SUGIYAMA, T. Expression of *Arabidopsis* response regulador homologs is induced by cytokinins and nitrate. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 429, p. 259-262, 1998.

TANKSLEY, S.D.; GANAL. M.W.; PRINCE, J.P.; DE VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Bethesda, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

TANKSLEY, S.D. Linkage map of tomato (*Lycopersicon esculentum*) (2N=24). In: O'BRIEN, J. (Ed.). Genetic maps: locus maps of complex genomes. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1993. p. 6.39-6.60.

TAYA, Y.; TANAKA, Y.; NISHIMURA, S. 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. **Nature**, London, v. 271, p. 545-547, 1978.

TAYLOR, I. B. Biosystematics of the tomato. In: ATHERTON, J.G.; RUDICK, J. (Ed.). **The tomato crop**: a scientific basis for improvement. New York: 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.

TEALE, W.D.; PAPONOV, I.A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 7, p. 847-859, 2006.

THEOLOGIS, A.; HUYNH, T.V.; DAVIS, R.W. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 183, p. 53-68, 1985.

THEOLOGIS, A.; RAY, P. M. Early auxin-regulated polyadenylylated mRNA sequences in pea stem tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 79, p. 418-421, 1982.

THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 681-683, 1986.

TIAN, Q.; REED, J.W. Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3* gene. **Development**, Cambridge, v. 126, p. 711-721, 1999.

TIMPTE, C.; LINCOLN, C.; PICKETT, F.B.; TURNER, J.; ESTELLE, M. The *AXR1* and *AUX1* genes of *Arabidopsis* function in separate auxin-response pathways. **The Plant** Journal, Oxford, v. 8, p. 561-569, 1995.

TIMPTE, C.S.; WILSON, A.K.; ESTELLE, M. Effects of the *axr2* mutation of *Arabidopsis* on cell shape in hypocotyl and inflorescence. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 271-278, 1992.

TREWAVAS, A. What remains of the Cholodny-Went theory? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 15, p. 759-794, 1992.

TREWAVAS, A.J.; CLELAND, R.E. Is plant development regulated by changes in the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? **Trends in Biochemical Science**, Amsterdam, v. 8. p. 354-357, 1983.

UEGUCHI, C.; SATO, S.; KATO, T.; TABATA, S. The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 42, p. 751-755, 2001.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Activation and repression of transription by auxin-response factors. **Proceeding of the National Academy of science of the USA**, Washington, v. 96, p. 5844–5849, 1997.

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

VAN DER HOERVEN, R.; RONNING, C.; GIOVANNONI, J.; MARTIN, G.; TANKSLEY, S. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 14, p. 1441-1456, 2002.

VENIS, M.A.; THOMAS, E.W.; BARBIER, B.H.; EPHRITIKHINE, G.; GUERN, J. Impermeant auxin analogues have auxin activity. **Planta**, Berlin, v. 182, p. 232-235, 1990.

VERNOUX, T.; KRONENBERGER, J.; GRANDJEAN, O.; LAUFS, P.; TRAAS, J. PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. **Development**, Cambridge, v. 127, p. 5157-5165, 2000.

VIETEN, A.; SAUER, M.; BREWER, P.B. FRIML, J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, p. 160-168, 2007.

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

WARD, S.P.; LEYSER, O. Shoot branching. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. **7**, p. 73-78, 2004.

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

WENT, F. On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. **Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen**, Amsterdam, v. 30, p. 10–19, 1926.

WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M. SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 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 the regulation of shoot and root meristem activity. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 15, p. 2532–2550, 2003.

WEST, A.H.; STOCK, A.M. Histidine kinases and response regulatorproteins in twocomponent signaling systems. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 369-376, 2001.

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.

WICKSON, M.; THIMANN, K.V. The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 11, p. 62-74, 1858.

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

WOBUS, U.; WEBER, H. Sugars as signal molecules in plant seed development. Journal of Biological Chemestry, Baltimore, v. 380, p. 937–944, 1999.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. Annals of Botany, Oxford, v. 95, p. 707-735, 2005.

YAMADA, H.; SUZUKI, T.; TERADA, K.; TAKEI, K.; ISHIKAWA, K.; MIWA, K.; YAMASHINO, T.; MIZUNO, T. The Arabidopsis AH\$ histidine kinase is a cytokininbinding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 41, p. 1017-1023, 2001.

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.

YE, Z.-H. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. Annual Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 53, p. 183-202, 2002.

YEVDAKOVA, N.A.; MOTYKA, M.; MALBECK, J.; TRÁVNÍČKOVÁ, A.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; SCHWARTZENBERG, K. Evidence for importance of tRNA-dependent

cytokinin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*. Journal of Plant Growth Regulation, New York, v. 27, p. 271-281, 2008.

YUSIBOV, V.M.; II, P.C.; ANDRIANOV, V.M.; PIRUZIAN, E.S. Phenotypically normal transgenic T-cyt tobacco plants as a model for the investigation of plant gene expression in response to phytohormonal stress. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 17, p. 825-836, 1991.

ZHANG, K.; DIEDERICH, L.; JOHN, P.C.L. The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, p. 308-316, 2005.

ZHANG, R.; ZHANG, X.; WANG, J.; LETHAM, D.S.; MCKINNEY, S.A.; HIGGINS, T.J.V. The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 84-94, 1995.

ZIMMERMANN, S.; THOMINE, S.; GUERN, J.; BARBIER-BRYGOO, H. An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATPdependent voltage regulation and is modulated by auxin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 707-716, 1994.

ZOBEL, R.W. Genetics and physiology of two root mutants in tomato, *Lycopersicon* esculentum MILL. Ph.D. (Dissertation) - University of California, Davis, CA, 1972.

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

ZOBEL, R.W. Control of morphogenesis in the ethylene-requiring tomato mutant *diageotropica*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v. 52, p. 735-741, 1974.

ZOBEL, R.W. Genetic control of root systems. In: WAISEL, Y., ESHEL, A., KAFKAFI, A. (Ed.). **Plant roots**: the hidden half. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 21-30.

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

ZUBKO, E.; ADAMS, C.J.; MACHAEKOVA, I.; MALBECK, J.; SCOLLAN, C.; MEYER, P. Activation tagging identifies a gene from Petunia hybrida responsible for the production of active cytokinins in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 797-808, 2002.

APÊNDICES

% MT	MT (BRT BRT)	Q O ⁿ brt (brt brt)	
50	F ₁	(BRT brt)	
		🚫 (Auto-polinização)	
	F_2	(<i>BRT BRT</i> , <i>BRT br</i> t, <u>brt brt</u>) Proporção: 1:2:1	
		BC (Retrocuzamento com MT)	
75	BC₁	(BRT brt)	
		вс	
87.5	BC ₂	(BRT BRT, BRT brt) Proporção: 1:1	
		\otimes	
	BC_2F_2	(<i>BRT BRT, BRT br</i> t, <i>brt br</i> t) Proporção: 5:2:1	
		вс	
93.75	BCa	(BRT brt)	
		вс	
96.87	BC₄	I (<i>BRT BRT, BRT br</i> t)Proporção: 1:1	
	·	\otimes	
	BC_4F_2	(<i>BRT BRT, BRT brt, <u>brt brt</u>)</i> Proporção: 5:2:1	
09.44	PC		
90.44	DC5		
00.00	PC		
99.22	DC ₆		
	BCcEo	(BRT BRT BRT bit bit bit) Proporção: 5:2:1	
		\otimes	
99.22	BC ₆ F ₆	: MT- <i>brt</i> (Linhagem quase isogênica)	

A simple, inexpensive and efficient way for genetic transformation of the tomato model system Micro-Tom

Lilian E. Pino-Nunes, Simone P. Lombardi, Mariana S. Azevedo, Tatiana B. Farinha, Lucélia Borgo, Vera Quecini, Antonio V.O. Figueira, Lázaro E.P. Peres.

L.E.P. Peres (corresponding author), L.E. Pino-Nunes, S.P. Lombardi, M.S. Azevedo, T.B. Farinha Department of Biological Sciences (LCB), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP) – Av. Pádua Dias, 11, CP 09, CEP 13418-900 Piracicaba - SP. Brazil. E-mail: <u>lazaropp@esalq.usp.br</u> Tel: +55-19-34294052 Fax: +55-19-34348295

L.E. Pino-Nunes, L. Borgo, A.V.O. Figueira Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), USP, Av. Centenário, 303, Piracicaba- SP 13400-970, Brazil.

V. Quecini

CNPUV, EMBRAPA. Rua Livramento, 515, CP 130 CEP 95700-000 Bento Gonçalves – RS. Brazil.

Abstract

Due to its small size and short life cycle, the cultivar Micro-Tom (MT) is regarded as a model system for tomato genetics. However, the efforts to improve the genetic transformation of MT have led to protocols dependent on the expensive hormone zeatin combined with an increased number of steps. Here, we report the development of a genotype, near isogenic to MT, harboring the allele Rg1 (MT-Rg1), which greatly improves tomato *in vitro* regeneration. Improved regeneration was also obtained in MT by a two days incubation period of cotyledonary explants in the auxin NAA before cytokinin treatment. Both strategies allowed the use of the cytokinin BAP, which is 100 times less expensive than zeatin. The use of MT-Rg1 and NAA pre-incubation, followed by BAP regeneration, resulted in high transformation frequencies, near 40%, even in a protocol with fewer steps and of approximately 40 days from *Agrobacterium* infection to transgenic plant acclimation.

Keywords: *Rg1* allele, functional genomics, *Agrobacterium*, shoot regeneration, genetic transformation

Introduction

The miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L) cultivar Micro-Tom (MT) is considered as a model system for tomato genetics (MEISSNER et al., 1997) and functional genomics based on genetic transformation (DAN et al., 2006; SUN et al., 2006). MT has traits comparable to *Arabidopsis*, such as small size and short life cycle, being adequate for large scale mutagenesis (MEISSNER et al., 1997; PINO-NUNES et al., 2009; WATANABE et al., 2007) and transgenic plant production (MATHEWS et al., 2003; MEISSNER et al., 1997). Besides, tomato is a model to study fleshy fruit development, whose knowledge can be extended to other important crops (EMMANUEL; LEVI, 2002).

Agrobacterium-mediated transformation of tomato has been explored since 80's, when McCormick and collaborators performed transformation assays in leaf disc using different cultivars (MCCORMICK et al., 1986). From then until now, these tools have quickly developed and several genetic transformation-related reports have been published in tomato. Transformation efficiencies ranging from 10-33% were obtained in different tomato cultivars (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2004; FRARY; EARLE, 1996; LING; KRISELEIT; GANAL, 1998; MCCORMICK et al., 1986;) and from 20-56% in MT (DAN et al., 2006;

PARK et al., 2003; QIU et al., 2007; SUN et al., 2006). Many parameters have been tested affecting the transformation efficiency, including the in vitro regeneration ability, which is basically determined by the plant genotype.

The wild species Solanum peruvianum is known to have a high in vitro shoot regeneration capacity (KOORNNEEF et al., 1986). At least part of this capacity is due to the presence of the allele Rg1 (KOORNNEEF; HANHART; MARTINELLI, 1987), which was mapped on chromosome 3 near to yellow fresh (r) allele, also present in S. peruvianum (KOORNNEEF et al., 1993). The allele r confers a yellow color of fruits and can be used as a morphological marker for the presence of Rg1. In a previous work, Rg1 allele was combined with the small size and short life cycle of MT in the new cultivar Micro-MsK (LIMA et al., 2004). Here, we created the MT-Rg1, which is a near-isogenic line of MT containing the Rg1 allele from Micro-MsK. We have also developed a hormone treatment during co-cultivation and regeneration that replaces the use of zeatin, which, although very expensive, is currently used in almost all tomato transformation protocols (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2004; DAN et al., 2006; FEDOROWICZ et al., 2000; FRARY; EARLE, 1996; LING; KRISELEIT; GANAL, 1998; PARK et al., 2003; QIU et al., 2007; RAJ et al., 2005; SUN et al., 2006). Combining the high regeneration capacity of MT-RgI and appropriate hormone treatments, we present a simple, inexpensive and efficient protocol for MT transformation. The method described here will provide invaluable tools to tomato functional genomics and make genetic transformation of MT, and probably other tomato cultivars, more accessible and widespread.

Materials and methods

Plant breeding and cultivation

The cultivar Micro-MsK of *Solanum lycopersicum* (LIMA et al., 2004), which harbors the dwarfing genes of Micro-Tom (MT) and the Rg1 allele from *S. peruvianum* (KOORNNEEF et al., 1993), was crossed and backcrossed to MT by conventional means in order to obtain a near-isogenic line (Fig. 1), named MT-Rg1. The miniature plants were grown in the greenhouse, in 150-ml pots containing a mixture (by volume) of 1:1 commercial substrate (Plantmax HT, Eucatex, Brazil) and expanded vermiculite, supplemented with NPK 10:10:10 (1 g/L) and lime (4 g/L). After each crossing, mature fruits were harvested and the seeds were cleaned of the pulp by fermenting for 12-h with commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisae*, Fermix, Brazil). Seeds were subsequentially washed and air-dried.

Plant transformation

Agrobacterium inoculation and in vitro regeneration

The plasmid pROKII was used to develop the transformation system using *Agrobacterium tumefaciens*. It contains a neomycin phosphotransferase II (*npt*II) gene, which confers resistance to kanamycin, driven by the *nos* promoter. This plasmid was transformed into the *A. tumefaciens* LBA4404 strain. *Agrobacterium* was initially grown in solid LB medium containing 50 mg/L rifampicin and 100 mg/L kanamycin for 48-h at 28°C. A single colony was transferred to 3-ml of liquid LB medium supplemented with the described antibiotics and cultivated at 28°C for 48-h with 120 rpm shaking. From the grown suspension, 500 μ L were taken and added to 50-ml of fresh LB medium with antibiotics in a 250-ml Erlenmeyer flask and cultivated at 28°C overnight under 120 rpm. The bacterial suspension was centrifuged at 3000 rpm for 15 min and the pellet resuspended in liquid basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), supplemented with 30 g/L sucrose and B5 vitamins (GAMBORG; MILLER, 1968), to a concentration of 0.2-0.3 at OD₆₀₀. Ten minutes before transformation, acetosyringone (AS) was added to the bacterial suspension to a final concentration of 100 μ M.

For the transfection assay, we have employed *A. tumefaciens* strain EHA105 harboring the binary vector pCambia1304. The T-DNA region of the transformation vector carries a translational fusion between the reporter genes *gusA* and *Egfp5* and the coding sequence of the *hpt* gene that confers hygromycin resistance, both driven by a *CaMV 35S* promoter. The bacterial cultured was performed as previously described.

Seeds from MT and MT-*Rg1* were surface-sterilized by shaking in 100-ml of 30% (v/v) commercial bleach (2.7% sodium hypochloride) plus two drops of commercial detergent, for 15 min, followed by three rinses with sterile water. The seeds were germinated in MS salts with half macro and micronutrients concentration, half B5 vitamins, 15 g/L sucrose and 6 g/L agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The pH was adjusted with KOH 1 M to 5.8 before autoclaving. Approximately 40 seeds were sown per flask, containing 30-ml medium. The flasks were sealed with PVC. The cultures were incubated at $25 \pm 1^{\circ}$ C in the dark for 4 days followed by 4 days under 16-h photoperiodic conditions given by one 40 W cool white fluorescent tube (c.a. 45 µmol PAR m⁻² s⁻¹).

Cotyledons were isolated from 8-day-old (from sowing) seedlings. The distal and proximal tips were removed and the cotyledons were divided transversally in two or three

pieces. Explants were placed abaxial side down in Petri dishes (90 x 15 mm) immediately after isolation, totaling 120 explants (6 Petri dishes with 20 explants each, n=6) per treatment. Explants were placed on solid MS medium, supplemented with 0.4 μ M NAA and 100 μ M AS. During this step (explanting), a Petri dish containing potassium permanganate salts was kept inside the laminar flow hood to avoid ethylene accumulation, which can impair further regeneration.

Agrobacterium suspension in liquid MS was dripped on the explants. The plates were incubated at room temperature and after 10 min the excess of bacterial suspension was removed with a sterile pipette. Explants were blotted dry on sterile filter paper. Plates were maintained in dark conditions at 28°C for 2 days for co-cultivation. Explants were then transferred to shoot inducing medium (solid basal MS medium supplemented with 5 μ M BAP) containing antibiotics (100 mg/L kanamycin and 25 mg/L Meropenem), cultured in 16h photoperiod at 25 ± 1°C for 3 weeks. One subculture was performed during this period. In all steps, plates were sealed with parafilm. Well-developed shoots (2-4 mm) were separated from the explants and transferred to grass jars containing 30-ml hormone free MS medium supplemented with 100 mg/L kanamycin and 25 mg/L Meropenem to elongation and rooting, which took 2 weeks. Grass jars were sealed with PCV.

In all media prepared, aqueous 5 mM stock solutions of BAP (0.0548g/50ml) and zeatin (0.0563g/50ml) and 0.4 mM NAA (0.0037g/50ml) were used. The salt of BAP and zeatin were dissolved with the aid of drops of HCL 1M on the salts of NAA was dissolved with the aid of drops of KOH 1M. Both hormone stocks were passed trough a sterile filter ($0.2 \mu m$) before added to the medium. The pH of the hormone stock solutions was not adjusted and they were added to autoclaved- and pH-adjusted-medium. No alterations in the pH of the final medium were observed after addition of the hormone stock solutions. The 100 mM AS stock solution (0.9811g/50ml of DMSO) were not sterilized or filtered before added to the bacteria suspension or pre-incubation medium. Stock solutions of AS, BAP and zeatin were made in a 1000x concentration, which allows the use of 1 ml of stock per litre of medium. Thus, the final concentration of the HCl, KOH of DMSO used in the stock solutions.

In order to avoid overestimation of transformation frequency, plants originated from the same area in the explant were considered as derived from non-independent transformation events. Transformation frequency was calculated by dividing the total number of independent transformation events (acclimated plants) by the total number of inoculated explants. Rooted T_0 plantlets were transferred to greenhouse for acclimation in 150-ml pots containing the same mixture described for plant breeding and cultivation. Transgenic plants were allowed to self-pollinate producing T_1 seeds and further on. T_1 and T_2 generations were confirmed for kanamycin-resistance in greenhouse by spraying the antibiotic (400 mg/L) in 14-day-old (from sowing) seedlings for 5 consecutive days (WEIDE; KOORNNEEF; ZABEL, 1989). Transgenic lines that remained green after kanamycin sprays (Fig. 3d) were selected. Transgenic T_1 lines that produced only kanamycin resistant T_2 seedlings were considered homozigous.

Transfection assay

For the transfection experiment, the explants were subjected to histochemical assay to detect GUS activity, as described by Jefferson (1987). The number of blue-colored GUS positive spots was correlated to the transfection rates and, therefore, as an indication of the bacterial affinity. Transfection assay were evaluated in 30 explants (3 Petri dishes with 10 explants each, n = 3) per treatment. The explants were considered GUS positive when exhibiting more than 50% of surface coverage with blue spots and negative when no blue spot was detected under stereomicroscope observation of the surface.

Molecular analysis

To identify the transformants, genomic DNA was extracted from acclimated T_0 plants using the method described by Fulton, Chunwongse e Tanksley (1995). Positive and negative controls employed DNA from non-transgenic plants and disarmed bacteria, and purified plasmid, respectively. The *neomycin phosphotransferase II (nptII)* gene was amplified by PCR using the forward primer sequence (5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG G-3') and reverse primer (5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA-3'). These primers amplify a fragment of 700 base pairs. Each polymerase chain reaction (20 µL) contained 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 100 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polimerase, 75 ng plant DNA and 5 µM final concentration of each primer. The reaction mixture was submitted to the following conditions: 1 min at 94°C, 30 cycles of amplification (1 min at 94°C, 30 s at 60°C and 2 min at 72°C) and 10 min at 72°C. The amplified fragments were subjected to the agarose gel electroforesis at 1% (w/v), using Tris-borate buffer at 0.5x. Ethidium bromide was used to stain the gel, which was afterwards photographed under ultraviolet light.

Results and Discussion

MT-Rg1: a line near-isogenic to MT containing an allele for high shoot formation in vitro

The Micro-MsK cultivar that combines the small plant size of MT with the high in vitro regeneration caused by the allele Rg1, from *S. peruvianum*, was previously described (LIMA et al., 2004). In the present work, Micro-MsK F₆ plants were backcrossed with MT six times. Plants were allowed to self-pollinate after each two backcrosses rendering BC₂F₂, BC₄F₂ and BC₆F₂ generations. In these generations homozygous plants with yellow fruit were selected, since the recessive *r* allele is closely linked to Rg1 (Fig. 1). Seeds from *rr* BC₆F₂ plants were *in vitro* germinated in order to test the high shoot formation from roots or cotyledon explants, confirming the presence of Rg1. After six generations of self-pollination (BC₆F₆), true-type plants harbouring the morphological marker *r* and the high regeneration allele Rg1 were named MT-Rg1 (Fig. 1). The genotype exhibits yellow fruits, high-branched shoots and delayed leaf senescence (Fig. 3a), as observed in Micro-MsK (LIMA et al., 2004), but MT-Rg1 plant height is slightly lower (data not shown), since MT-Rg1 is genetically closer to MT than Micro-MsK. Upon request, seeds of MT-Rg1 are available for interested researchers.

Improving Micro-Tom in vitro shoot regeneration in the presence or absence of Rg1 allele

Although MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962) is the most used medium in tissue culture, tomato cotyledon explants do not develop very well on this medium. It was demonstrated that a 4-fold increase in thiamine concentration in MS was able to improve the performance of tomato explants in vitro (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2004). In this work, MS medium used in all experiments (seed germination, regeneration and co-cultivation) contained B5 vitamins (GAMBORG; MILLER, 1968), where the thiamine concentration is 10-fold higher than in MS vitamins. In accordance to these observations, B5 vitamin-based medium is recommended for tomato regeneration (DAN et al., 2006; QIU et al., 2007; RAJ et al., 2005).

The most used cytokinin in promoting shoot formation in genetic transformation of tomato is zeatin, due to its higher regeneration efficiency compared to other cytokinins (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2004; DAN et al., 2006; FEDOROWICZ et al., 2000; FRARY; EARLE, 1996; LING; KRISELEIT; GANAL, 1998; PARK et al., 2003; QIU et al., 2007; RAJ et al., 2005; SUN et al., 2006). We compared the regeneration frequency in cotyledon explants of MT and MT-*Rg1* genotypes, using MS medium supplemented with zeatin or 6-Benzylaminopurine (BAP). The regeneration frequency was significantly higher in MT-*Rg1* in both treatments (Fig. 2a), being 2.9-fold and 1.2-fold higher in BAP and zeatin treatments, respectively. These results confirm that the *Rg1* allele increase the regeneration capacity, as shown in Micro-MsK (LIMA et al., 2004). Regeneration frequency of MT in zeatin did not differ significantly to that of MT-*Rg1* in BAP (Fig. 2a). These observations open the possibility to use a less expensive plant hormone (BAP) combined with a high-regenerating genotype (MT-*Rg1*) instead of zeatin in protocols for tomato.

Since the original work of Skoog & Miller in 50's (SKOOG; MILLER, 1957), many studies of in vitro regeneration were based on the control of the auxin-to-cytokinin ratio. Valvekens, Van Montagu e Van Lijsebettens (1998) developed a protocol using two steps. The first step is based on a medium that contains a high auxin-to-cytokinin ratio, which induces cell proliferation, named Callus Inducer Medium (CIM). It is believed that the initial auxin pulse leads the cells to acquire the competence to form shoots (CARY et al., 2001; CHE et al., 2007; CHRISTIANSON; WARNICK 1983). Subsequentially, explants are transferred onto a medium with high cytokinin-to-auxin ratio to form shoots. This protocol is extensively used nowadays, mostly for Arabidopsis. However, in tomato, excess callus proliferation is negatively correlated with shoot regeneration (PERES et al., 2001). This led us to test a preincubation period for the explants in a Root Inducer Medium (RIM) (WANG et al., 2005) instead of CIM. While CIM is characterized by high auxin-to-cytokinin ratio that usually induces callus formation, RIM solely contains auxin, which favors root formation. This initial pulse of auxin (pre-incubation in a RIM medium) followed by cytokinin incubation resulted in a higher regeneration frequency in MT (Fig. 2b). Although the regeneration of MT in MS medium with BAP was significantly lower than in MS medium with zeatin, the pre-incubation of MT explants in 0.4 µM NAA (RIM) for two days followed by 19 days in 5 µM BAP showed equivalent regeneration frequency of MT explants incubated in zeatin, without preincubation in NAA (Fig. 2b). The pre-incubation in NAA followed by incubation in zeatin also increased the in vitro regeneration but was not statistically different from the results of direct incubation in zeatin (Fig. 2b). Combining the pre-incubation in NAA and incubation in

BAP, which are relatively affordable hormones, a regeneration frequency of 80% was attained for MT, similar to the values observed for direct incubation in zeatin.

In order to further investigate the high-transformation rates observed in the novel MT-*Rg1* genotype in comparison to MT, we have assayed the transfection rates using the overvirulent *A. tumefaciens* strain EHA105, carrying a translational fusion between GUS and GFP reporter genes. *In situ* detection of GUS staining is considered as an indirect measure of the transgene delivery to the plant cells (JEFFERSON, 1987; UEKI et al., 2009). Our results showed that gene delivery via *Agrobacterium* was similar in MT and MT-*Rg1* explants (Fig. 2c). Thus, indicating that the higher transformation rates observed are due to its increased regeneration ability rather than a more favorable interaction with the bacterium.

A simple, inexpensive and efficient transformation protocol based on NAA pre-incubation and/or MT-Rg1

Based on the high regeneration ability of MT-Rg1 and the auxin pre-incubationmediated increase of regeneration, we tested the protocol on the transformation of MT and MT-Rg1. The protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation is summarized in Fig. 4. Transformation frequency was higher in MT incubated in NAA followed by BAP when compared to MT incubated in zeatin (Table 1). MT-Rg1 has shown transformation frequency of approximately 40%. It was higher than MT in both treatments (Table 1). This frequency is comparable to those reported in the best protocols published for tomato transformation (CORTINA; CULLÁÑEZ-MACIÀ, 2004; DAN et al., 2006; LING; KRISELEIT; GANAL, 1998; SUN et al., 2006). Besides, using BAP instead zeatin makes the transformation more affordable, since zeatin is approximately 100-fold more expensive than BAP. MT and MT-Rg1 transgenic plants were obtained in approximately 105 days from seed to seed (Fig. 4). It is of common belief that the majority of the steps performed in tomato transformation protocols are actually in order to overcome the low regeneration efficiency of the species. The use of high regenerating MT-Rg1 coupled with the pre-incubation step with NAA made the present protocol feasible and reproducible.

Although Rg1 is genetically linked to r allele, it will not limit the use of MT-Rg1 in studies of regeneration and transformation. When the afore mentioned allele, and even the Rg1, is not desirable, it can be segregated from the transgene T₁ generation using kanamycin application in greenhouse. Thus, plants without r allele but containing the transgene can be

selected and multiplied. Moreover, except for studies of carotenoid biosynthesis, the yellow fruit phenotype will not interfering in the interpretation of the results.

Additional to the hormonal treatment and the MT-*Rg1* genotype, two factors can be considered in the efficiency of the present transformation protocol: the use of Acetosyringone (AS) and the antibiotic Meropenem. AS was added to the *Agrobacterium* suspension before co-cultivation and also in the solid MS medium used for co-cultivation. AS is a compound that stimulates the action of virulence genes (NADOLSKA-ORCZYK; ORCZYK, 2000) and improves the transformation efficiency (CORTINA; CULIÁÑEZ-MACIÀ, 2004; STACHEL; NESTER; ZAMBRYSKI, 1986; WU et al., 2006). Many antibiotics have been used in tomato to eliminate the bacteria once their presence is no longer required. In this work, we tested Augmentin, cefotaxime and Meropenem (Antibióticos do Brasil Ltda, Brazil). Contrasting to cefotaxime and Augmentin, Meropenem successfully suppressed growth of bacteria at low concentration (25 mg/L) and has no phytotoxic effect. It is a carbapenem class of antibiotics and has broad spectrum against highly resistant organisms (ASBEL; LEVISON, 2000; KIZIRGIL et al., 2005).

Prospects for tomato functional genomics

The International Solanaceae Genome Project (SOL) started in 2003 with the cooperation of researchers around the world to sequence the 12 tomato chromosomes (MUELLER et al., 2005). Functional genomics tools are increasingly required to explore the information provided by the genome project. Micro-Tom is considered a useful genotype for functional genomics, and has already been used for chemical (PINO-NUNES et al., 2009; WATANABE et al., 2007), physical (MATSUKURA et al., 2007; PINO-NUNES et al., 2009) and insertional (MATHEWS et al., 2003; MEISSNER et al., 2000) mutagenesis, as well as for gene expression analysis (DAN et al., 2006; PARK et al., 2003; QIU et al., 2007; SUN et al., 2006). In order to dissect and study the function of target genes via transgenic plants, a great number of transgenic lines are necessary. Therefore the transformation protocols need to be highly efficient, simple, easily reproducible and using inexpensive chemicals.

In comparisom to the useful Micro-Tom cultivar in functional genomic studies, the genotype MT-Rg1 has a higher regeneration frequency and an easily identifiable morphological marker. Thus, MT-Rg1 consists in a powerful tool to study regeneration and genetic transformation but also in studies of fruit development, since it can be used for functional genomic analysis of sequences from other commercially important crops.

Interactions between plant and mycorhiza (ZSÖGÖN et al., 2008) and plant and pathogens (ARIE et al., 2007; MARTÍ et al., 2006) can also be explored. Although Rg1 has been used to unravel the genetic bases of the regeneration in the *S. lycopersicom* background (BOITEN et al., 2004), the MT-Rg1 genotype has the advantages of the MT background, which makes its performance fully comparable in all experiments performed.

	Genotypes	
Hormones	MT	MT- <i>Rg1</i>
21d Zeatin	21.25 ± 2.46	38.00 ± 7.38
2d NAA + 19d BAP	25.02 ± 3.29	37.25 ± 8.95

Table 1 – Transformation efficiency (%) of MT and MT-Rg1 in two regeneration media

Means followed by the Standard Errors (SE) correspond to six independent transformation experiments (n = 6)





Figure 2. Shoot regeneration and transfection assays from cotyledon explants in MT and MT-*Rg1*. Comparison between different genotypes (a) and shoot inducing media (b). **a** Regeneration of MT and MT-*Rg1* were tested in MS medium supplemented with 5 μ M BAP or 5 μ M Zeatin. **b** Two different shoot inducing media were used to compare the regeneration ability of MT. The cotyledon explants were maintained for 2 days in MS medium supplemented with 0.4 μ M NAA followed by 19 days in MS medium supplemented with 5 μ M BAP or 5 μ M zeatin, without pre-incubation in NAA. **c** Effect of the genotype on *Agrobacterium*-mediated gene transfection, as indicated by histochemical GUS in transient transformation (see Material and Methods). Vertical bars indicate \pm standard deviation of the mean (a and b: n = 7; C: n = 3). Different letters indicate significant differences at P \leq 0.05 (unpaired Student's t-test). The absence of statistic significance is represented by n.s.



Figure 3. Phenotype of MT and MT-Rg1 and selection of transgenic lines. **A.** Phenotype of adult MT and MT-Rg1 plants. The presence of the *r* and Rg1 alleles resulted in yellow fruits and branched shoot, respectively, in the MT-Rg1 genotype (right). **B**. *In vitro* regeneration in absence (top) and presence (bottom) of 100 mg/L kanamycin. The two plates at the bottom of the figure contain explants preincubated with *Agrobacterium* harboring the *nptII*-containing vector pROKII. **C**. Analyses of *nptII* gene in T₀ transgenic plants by agarose gel electrophoresis of PCR amplification of a 700 bp fragment of *nptII* gene and DNA molecular marker (100 bp). **D**. Selection of segregating T₁ lines performed in the greenhouse by spraying 400 mg/L kanamycin in 14-day-old seedlings for 5 consecutive days. Bars = 4 cm.



Figure 4. Schematic representation of the protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of MT. The horizontal line represents the timeline for each step. Vertical arrows represent successive steps carried out simultaneously.

The following are acknowledged: FAPESP (grant 02/00329-8 and fellowship 04/15268-0) and CNPq (grant 475494/03-2 and fellowship 308075/03-0) for financial support.

References

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

ASBEL, L.E.; LEVISON, M.E. Cephalosporins, carbapenems, and monobactams. **Infectious Disease Clinics of North America**, St. Louis, v. 14, p. 435-447, 2000.

BOITEN, H.; AZMI, A.; DILLEN, W.; DE SCHEPPER, S.; DEBERGH, P.; GERATS, T.; VAN ONCKELEN, H.; PRINSEN, H. The Rg-1 encoded regeneration capacity of tomato is not related to an altered cytokinin homeostasis. **The New Phytologist**, London, v. 161, p. 761-771, 2004.

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A., HOWELL, S.H. Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 700-707, 2001.

CHE, P.; LALL, S.; NETTLETON, D.; HOWELL, S.H. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in Arabidopsis tissue culture. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 1183-1194, 2007.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. **Developmental Biology**, New York, v. 95, p. 288-293, 1983.

CORTINA, C.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A. Tomato transformation and transgenic plant production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 76, p. 269-275, 2004.

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

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

FEDOROWICZ, O.; BARTOSZEWSKI, G.; STOEVA, P.; NIEMIROWICZ-SZCZYTT, K. Agrobacterium-mediated transformation of cultivated tomato with construct carrying the nucleoprotein (N) gene from tomato spotted wilt virus (TSWV) **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 22, p. 277-281, 2000.

FRARY, A.; EARLE, E.D. An examination of factors affecting the efficiency of Agrobacteriummediated transformation of tomato. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, p. 235-240, 1996. FULTON, T.M.; CHUNWONGSE, J.; TANKSLEY, S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 13, p. 207-209, 1995.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 5, p. 387-405, 1987.

KIZIRGIL, A.; DEMIRDAG, K.; OZDEN, M.; BULUT, Y.; YAKUPOGULLARI, Y.; TORAMAN, Z. In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae blood isolates. **Microbiological Research**, Paris, v. 2, p. 35-140, 2005.

KOORNNEEF, M.; BADE, J.; HANHART, C.; HORSMAN, K.; SCHEL, J.; SOPPE, W.; VERKERK, 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.; HANHART, C.; JONGSMA, M.; TOMA, I.; WEIDE, R.; ZABEL, P.; HILLE, J. Breeding of a tomato genotype readily accessible to genetic manipulation. **Plant Science**, New York, v. 45, p. 201-208, 1986.

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

LIMA, J.E.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Callus, shoot and hairy root formation *in vitro* as affected by the sensitivity to auxin and ethylene in tomato mutants. **Plant Cell Reports** in press, 2009

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.

LING, H.Q.; KRISELEIT, D.; GANAL, M.W. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in Agrobacterium-mediated transformation of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, p. 843-847, 1998.

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

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.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; KABAYASHI, Y.; YIN, Y.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiationinduced mutant lines of the miniature tomato (Solanum lycopersicum L.) cultivar 'Micro-Tom'. **Plant Biotechnology**, Dorbrecht, v. 24, p. 39-44, 2007.

MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (L. esculentum) using Agrobacterium tumefaciens. **Plant Cell Reports**, New York, v. 5, p. 81-84, 1986.

MEISSNER, R.; CHAGUE, V.; ZHU, Q.; EMMANUEL, E.; ELKIND, Y.; 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. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MUELLER, L.A.; SOLOW, T.H.; TAYLOR, N.; SKWARECKI, B.; BUELS, R.; BINNS, J.; LIN, C.; 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**, Rockvile, v. 138, p. 1310-1317, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-479, 1962.

NADOLSKA-ORCZYK, A.; ORCZYK, W. Study of the factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of pea (Pisum sativum L.) **Molecular Breeding**, Berlin, v. 6, p. 185-194, 2000.

PARK, S.H.; MORRIS, J.L.; PARK, J.E.; HIRSCHI, K.D.; SMITH, R.H. Efficient and genotypeindependent Agrobacterium-mediated tomato transformation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1253-1257, 2003.

PASTERNAK, T.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H.; VAN ONCKELEN, H.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (Medicago sativa L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1807-1819, 2002.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P.G.; VECHI, C.; KRAUS, J.E.; VAN SLUYS, M-A Shoot regeneration capacity from roots and transgenic hairy root of different tomato cultivars and wild related species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 37-44, 2001.

PINO-NUNES, L.E.; FIGUEIRA, A.V.O.; TULMANN NETO, A.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F.A.; SILVA, J.A.; BERNARDI, W.F.; PERES, L.E.P. Induced mutagenesis and natural genetic variation in tomato 'Micro-Tom'. Acta Horticulturae, The Hague, v. 821, p. 63-72, 2009.

QIU, D.; DIRETTO, G.; TAVARZA, R.; GIULIANO, G. Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v. 112, p. 172-175, 2007.

RAJ, S.K.; RACHANA SINGH, PANDEY, S.K.; SINGH, B.P. Agrobacterium-mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing Tomato leaf curl virus coat protein gene for resistance against TLCV infection. **Current Science**, Bangalore, v. 88, p. 1674-1679, 2005.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-130, 1957.

STACHEL, S.E.; NESTER, E.W.; ZAMBRYSKI, P.C. A plant cell factor induces Agrobacterium tumefaciens vir gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 83, p. 379-383, 1986.

SUN, H.J.; UCHII, S.; WATANABE, S.; EZURA, H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, San Francisco, v. 47, p. 426-431, 2006.

UEKI, S.; LACROIX, B.; KRICHEVSKY, A.; LAZAROWITZ, S.G.; CITOVSKY, V. Functional transient genetic transformation of Arabidopsis leaves by biolistic bombardment. **Nature Protocols**, New York, v. 4, p. 71-77, 2009. Disponível em: http://www.nature.com/nprot/journal/v4/n1/full/nprot.2008.217.html

VALVEKENS, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN LIJSEBETTENS, M. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of A. thaliana root explants by using kanamycin seletion. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 85, p. 5536-5540, 1998.

WANG, H.; JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S.; LATCHÉ, 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, S.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, K.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of Solanum lycopersicon cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, Dorbrecht, v. 24, p. 33-38, 2007.

WEIDE, R.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P. A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 78, p. 169-172, 1989.

WU, Y.F.; CHEN, Y.; LIANG, X.M.; WANG, X.Z. An experimental assessment of the factors influencing Agrobacterium-mediated transformation in tomato. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 53, p. 252-256, 2006.

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