

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

**Estudo de variações genéticas naturais de *Solanum galapagense*
possivelmente relacionadas com alterações no hormônio giberelina**

Clarissa dos Santos Goldenberg

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

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Clarissa dos Santos Goldenberg
Engenheiro Agrônomo

**Estudo de variações genéticas naturais de *Solanum galapagense*
possivelmente relacionadas com alterações no hormônio giberelina**

Orientador:

Prof. Dr. LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA PERES

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

Piracicaba
2009

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

Goldenberg, Clarissa dos Santos

Estudo de variações genéticas naturais de *Solanum galapagense* possivelmente relacionadas com alterações no hormônio giberelina / Clarissa dos Santos Goldenberg . - - Piracicaba, 2009.
80 p. : il.

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

1. Cruzamento vegetal 2. Dormência em plantas 3. Hormônios vegetais 4. Nanismo vegeta
5 Tomate 6. Variação genética I. Título

CDD 635.642
G618e

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

Dedicatória

Aos meus pais Nélia e Samuel, com amor.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) por contribuir de forma tão especial em minha formação profissional;

Ao Departamento de Ciências Biológicas, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, pela orientação e pelo valioso aprendizado ao longo de todo o Mestrado;

Aos professores com quem tive a honra de cursar as disciplinas do curso: Ricardo Ferraz de Oliveira, Murilo de Melo, Beatriz Appezzato-da-Glória, Lázaro Eustáquio Pereira Peres, Maria Lúcia Carneiro Vieira, Ricardo Alfredo Kluge;

Aos colegas de laboratório, em especial aos amigos Fernando Piotto e Rogério Carvalho;

Ao pessoal da Horticultura Vitti e Miranda pelos auxílios na casa-de-vegetação;

À querida Maria Solizéte Granziol Silva pela eficiência e disposição constante em auxiliar nós alunos do PPG Fisiologia e Bioquímica de Plantas;

A minha família, primos, tios, avós, meu alicerce, que mesmo distantes fisicamente sempre se fizeram presentes de maneira tão íntegra;

Ao meu irmão Theo, por compreender a distância e ausência da “irmã mais velha”, pelo amor e pela alegria;

Ao Marcelo, pela paciência, apoio, amizade e carinho e incentivo;

Aos colegas Luciana Carlini-Garcia e ao Augusto Garcia por serem pessoas brilhantes em seus valores e em termos profissionais;

Aos colegas de Pós Graduação Helen Penha, Maria Marta Pastina, Gabriel Margarido, pelos agradáveis momentos compartilhados;

Aos amigos de sempre Camila Reis, Gabriel Falcão, Renata Ilha e Juliana Curi;

À minha mãe, amiga de todas as horas e incentivadora incondicional, por acreditar em meus sonhos; ao meu querido pai, meu ídolo e exemplo profissional, e ao Sette, meu amigo que tanto admiro;

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

A Deus, meu anjo da guarda, por me proteger e iluminar meus caminhos;

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.1.1 A importância da variação genética natural para estudos fisiológicos	21
2.1.2 <i>Solanum galapagense</i>	22
2.1.3 Giberelinas.....	27
2.1.4 Micro-Tom como modelo genético	32
2.2 Objetivos.....	34
2.3 Material e métodos	34
2.3.1 Infra-estrutura	34
2.3.1.1 Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCHDV)	34
2.3.1.2 Casa de Vegetação.....	35
2.3.2 Semeadura e cultivo.....	36
2.3.3 Cruzamentos e / ou retrocruzamentos	35
2.3.4 Colheita e processamento dos frutos	36
2.3.5 Estocagem das sementes.....	38
2.3.6 Teste de germinação	38
2.3.7 Avaliação de altura	39
2.3.8 Curva de dose-resposta hormonal.....	40
2.3.9 Avaliação do índice de recorte foliar.....	40
2.3.10 Registros fotográficos.....	42
2.3.11 Análise estatística	42
2.4 Resultados.....	42
2.4.1 Obtenção e caracterização de híbridos entre <i>S.galapagense</i> e tomateiro (<i>S.lycopersicum</i> cv. Micro-Tom)	42

2.4.2 Introgessão do nanismo de <i>S.galapagense</i> em MT	50
2.4.3 Caracterização do nanismo	60
2.5 Discussão	67
3 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Estudo de variações genéticas naturais de *Solanum galapagense* possivelmente relacionadas com alterações no hormônio giberelina

As espécies selvagens relacionadas ao tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L) em latitudes do Sul do Equador ao norte do Chile. Estas condições ambientais contrastantes possibilitaram o aparecimento de grande diversidade genética dentre estas espécies. *Lycopersicon cheesmanii* f. *minor* (Hook.f.) C. H. Hill. Syn. *Solanum galapagense* S. Darwin & Peralta é endêmica das Ilhas Galápagos e possui características peculiares, como porte reduzido, dormência de sementes e folhas bastante recortadas. Estas características também estão presentes em mutantes de tomateiro com deficiência no hormônio giberelina (GA). Mutações em GA como *gib1*, *gib2*, *gib3* (deficientes) e *procera* (resposta constitutiva) são amplamente conhecidas em tomateiro. Já os alelos *Sp* (*Self Pruning*) e *Pts* (*Petroselinum*), presentes em *S. galapagense*, alteram altura e recorte foliar, respectivamente. Visando entender a natureza destas variações genéticas naturais, foram feitos cruzamentos e retrocruzamentos sucessivos de *S. galapagense* com a cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT), onde tentou se isolar plantas segregando para características presentes no parental selvagem (dormência, nanismo e maior recorte foliar). Na geração BC₁F₂ foram selecionados indivíduos com porte menor que MT e folhas com bordos muito recortados. Sementes BC₁F₃ apresentaram taxa de germinação de 47,6 %, contrastando com o valor 94,5 % apresentado por MT. Entretanto, após aplicação de 100 µM de GA₃ a taxa de germinação de BC₁F₃ foi elevada para 72 %. Em análise de curvas de dose-resposta a GA, as plantas BC₁F₃ apresentaram menor porte que MT, sendo que este nanismo não foi completamente revertido aplicando-se GA. Em gerações avançadas de retrocruzamentos, constatou-se que a dormência de sementes foi perdida durante as introgressões. Tal constatação leva a crer que o principal componente da dormência de *S. galapagense* não está ligado ou é efeito pleiotrópico dos genes que respondem pelo seu nanismo ou recorte foliar. A análise de segregação de 278 plantas BC₄F₂ mostrou que o principal componente do nanismo de *S. galapagense* segrega na proporção 3:1, sendo a mutação recessiva presente em *S. galapagense* denominada *galapagos dwarf* (*gdw*). Plantas quase isogênicas a MT (geração BC₆F_n) foram obtidas carregando os alelos *Pts*, *Sp* e *gdw*. Experimentos comparando-as com MT confirmaram que o alelo *Pts* aumenta pronunciadamente o recorte foliar de tomateiro e diminui ligeiramente a germinação e o porte das plantas. Tal observação está de acordo com a descoberta recente de que *PTS* codifica para um gene da classe *KNOX*, que podem estar envolvidos com GA. Em combinação com *Pts*, esse alelo parece ter efeito discreto no recorte foliar, mas somente em combinação com *Pts*. Surpreendentemente, sementes *Sp* tiveram germinação precoce, comparadas com MT (*sp*). Já o alelo *gdw* não mostrou ter efeito na germinação, mas confirmou afetar a altura e o recorte foliar. Esses resultados evidenciam que porte reduzido e folhas bastante recortadas de *S. galapagense* podem ser atribuídos principalmente a *gdw* e *Pts*. A dormência parece ser controlada por outro(s) gene(s) ainda desconhecido(s). Como o novo gene descoberto, *GDW*, não afeta a germinação, é pouco provável que esteja ligado a GA, podendo ser uma nova classe de genes controlando nanismo.

Palavras-chave: Arquitetura foliar; Dormência de sementes; Giberelina; Nanismo; *Petroselinum*; *Solanum galapagense*; Variação genética natural

ABSTRACT

Study of natural genetic variations of *Solanum galapagense* possibly related to changes in the hormone gibberellin

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn. *Solanum lycopersicum* L) related wild species evolved into a wide range of latitudes, from the southern of Ecuador to the northern of Chile. These contrasting environment conditions allowed the emergence of great genetic diversity among these species. *Lycopersicon cheesmanii* f. *minor* (Hook.f.) C. H. Hill. Syn. *Solanum galapagense* S. Darwin & Peralta is endemic in the Galapagos Islands and has characteristics such as small plant size, dormant seeds and profusely divided leaves, being these characteristics also common in tomato gibberellin (GA) mutants. GA mutants such as *gib1*, *gib2*, *gib3* (deficient), and *procera* (constitutive) are widely known in tomato. In addition to the aforementioned mutations, the alleles *Sp* (*Self Pruning*) and *Pts* (*Petroselinum*), present *S. galapagense*, lead to changes in plant height and leaf architecture, respectively. Aiming at the understanding of such natural genetic variations, successive crosses and backcrosses of *S. galapagense* with the miniature tomato cultivar Micro-Tom (MT) were made, attempting to isolate plants segregating characteristics of the parental wild species (dormancy, dwarfism, and increased leaf indentation). In the BC₁F₂ generation were selected individuals shorter than MT, and with more serrated leaf margins or with more leaflets when compared to MT. BC₁F₃ seeds showed germination rates of only 46.7 %, contrasting with the 94.5% of MT's germination. However, after the application of 100 µM GA, the rate of germination of BC₁F₃ was increased to 72 %. Analysis GA dose-responses showed that the BC₁F₃ plants displayed smaller sizes than the MT plants, and this dwarfism was not completely reversed by GA applications. In advanced backcross generations, it was found that the dormancy of seeds was lost during the process of introgression, since the selection was not for this trait, but only for plant with small size and/or more divided leaves. This finding suggests that the main component of dormancy of *S. galapagense* is not connected to or is not a pleiotropic effect of the genes for dwarfism and leaf shape. The analyzes of the segregation of 278 BC₄F₂ plants, already harboring the alleles *sp* and *pts* from MT, showed that the main component of the dwarfism of *S. galapagense* segregates in the proportion 3:1, and then, the recessive mutation present in this specie was named *galapagos dwarf* (*gdw*). Plants nearly isogenic to MT (BC₆F_n generation) were obtained carrying the alleles *Pts*, *Sp* and *gdw*. Experiments comparing these plants with MT confirmed that the allele *Pts* produces more divided leaf and leaflets, and showed that this allele has a slight effect in reducing seed germination and plant size. This observation is consistent with the recent discovery that *Pts* codes for a gene from the *KNOX* class, which may be involved with the GA hormone. The *Sp* allele had no direct effect on plant height, but only indirectly due to its indeterminate growth. This allele seems to have a slight effect on leaf shape, but only in combination with *Pts*. Surprisingly, *Sp* seeds had an early germination when compared to MT (*sp*). On the other hand, the allele *gdw* did not show any effect on germination, but confirmed to affect plant height and leaf architecture. Taken together, these results showed that the reduced plant size and the profusely divided leaves of *S. galapagense* can be attributed mainly to the effect of *Pts* and *gdw* alleles. Regarding seed dormancy, this trait appears to be controlled by other(s) gene(s), yet unknown, although *Pts* also contributes to this characteristic. Since the new gene that we discovered, *GDW*, does not affect the germination, it is unlikely that it can be linked the GA hormone, but it may represent a new class of genes controlling an important agronomic trait, the dwarfism.

Keywords: Leaf architecture; Seed dormancy; Gibberellin; Dwarfism; *Petroselinum*; *Solanum galapagense*; Natural genetic variation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mapa da distribuição de *S.galapagense* nas Ilhas Galápagos (pontos coloridos em destaque), sendo a cultura de tomateiro presente em 19 ilhas diferentes ao longo do arquipélago.....26
- Figura 2 – Fenótipo de *Solanum galapagense*. Em destaque entrenó curto, folha com típico recorte acentuado e coloração dos frutos nas fases de pré - maturação e na maturação.....27
- Figura 3 – Estrutura do anel *ent*-caureno (A). Estrutura de GA₁ e GA₄ (B) e GA₃ e GA₇ (C), exemplificando os tipos de GAs dependendo do radical ligado ao carbono.....29
- Figura 4 – Estágios da biossíntese de GA. (A) Primeira etapa, nos plastídeos, em que há síntese de *ent*-caureno. (B) No Retículo endoplasmático esta estrutura sofre oxidação formando o precursor das GAs. (C) Conversão deste precursor (GA₁₂) em GAs.....31
- Figura 5 – Fenótipo de MT (*spsp*), à direita, e MT *Sp* BC₆F_n (à esquerda).....33
- Figura 6 – Estrutura de cultivo das plantas em casa de vegetação. Em destaque detalhes do sistema de irrigação e ventilação.....35
- Figura 7 – Detalhe dos botões florais aptos à emasculação, botões emasculados em que algumas de suas sépalas são removidas no momento do procedimento de emasculação e botões mais recentes candidatos a serem removidos da planta.....37
- Figura 8 – Modelo gráfico obtido pelo *scanner* para a leitura de área e perímetro no software Quant. Neste exemplo trata-se da imagem de folha de MT.....41

Figura 9 – Representação esquemática dos cruzamentos iniciais de *Solanum galapagense* LA1401 com a cultivar miniatura de tomateiro MT, até a obtenção da geração BC₁F₃, para seleção de plantas de porte micro. Abaixo, fenótipo apresentado por estas plantas em que se pode observar entrenó curto, crescimento indeterminado, recorte foliar pronunciado e frutos de coloração verde escuro.....44

Figura 10 – Teste de sensibilidade a giberelina. A) Teste de germinação dos genótipos MT e BC₁F₃ (isolado de *Solanum galapagense*) em água destilada, e em solução contendo 100 µM de ácido giberélico (GA₃). Foram feitas três repetições por genótipo, sendo cada uma composta por 50 sementes. B) Curva de dose-resposta a GA₃ dos genótipos *pro*, MT, *gib3* e BC₁F₃ para estudo de altura. C) Alturas finais aos 41 dias de BC₁F₃, MT, *pro* e do duplo mutante *BC1F3pro*. Avaliações seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,05$, Tukey). Para altura foram usadas dez repetições por genótipo.....47

Figura 11 – Efeito da aplicação de 100 µM de giberelina (+ GA₃) em MT e BC₁F₃, e o impacto nas alterações da arquitetura foliar em duplos mutantes de MT e BC₁F₃ com os mutantes em GA *gib3* (deficiente) e *pro* (supersensível). Barra = 2 cm.....49

Figura 12 – Representação esquemática de cruzamentos e retrocruzamentos realizados no processo de isolamento de *gdw*, e as composições alélicas de cada genótipo. *Pts*: *Petroselinum*; *Sp*: *Selfpruning*; *gdw*: *galapagos dwarf*; *B*: *Beta*.....51

Figura 13 – Descrição fenotípica do teste de segregação na geração BC₂F₂ avaliadas na antese. A) Total de plantas menores que 8 cm (tamanho médio de MT) e maiores ou iguais a 8 cm, sendo 238 o total de plantas avaliadas. B) Número de plantas com porte determinado (*sp*) e indeterminado (*Sp*), sendo avaliadas 239 plantas. C) Quantidade de plantas que formaram fruto verde claro e verde escuro, sendo avaliadas 232 plantas. Valores de χ^2 não significativos indicam segregação 3:1.....53

Figura 14 – Altura e índice de recorte foliar em plantas elite na geração BC₂F₃, além dos genótipos MT, *Pts Sp BC₆F_n*, *Pts sp BC₆F_n* e BC₁F₅ na antese. A) Altura média na antese dos referidos genótipos. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$, t de Student). B) Área e perímetro foliar médio destas plantas. A razão área/perímetro é inversamente proporcional ao nível de recorte foliar.....55

Figura 15 – Caracterização do porte de plantas elites nas gerações BC₂F₄ e BC₃ no momento da antese. A) Altura média de plantas elites BC₂F₄, MT, MT *Sp BC₆F_n* e BC₁F₅. B) Altura média de plantas elites BC₃ e MT. Segundo teste F, médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,05$, t de Student).....57

Figura 16 – Avaliação da germinação de sementes. A) Germinação monitorada a cada 12 horas testando MT, *Pts Sp BC₆F_n*, BC₁F₅, Elite 157 BC₂F₃ e *Pts sp BC₆F_n*. B) Germinação de MT, MT *Sp BC₆F_n*, *Pts sp BC₆F_n*, *Pts Sp BC₆F_n* e duas elites na geração BC₂F₄ (neste caso, 157 e 194). As avaliações foram feitas a cada 24 horas. Para ambos os gráficos foram feitas 3 repetições, cada uma contendo 50 sementes.....59

Figura 17 – Estudo de recorte foliar em genótipos contrastantes (representado pela razão entre área e perímetro), e os valores individuais de área e perímetro. A) MT *versus* MT *Sp BC₆F_n*. B) MT *Sp BC₆F_n* *versus* *Pts Sp BC₆F_n*. C) MT *versus* Elite 157 BC₃F₃. Médias seguidas por letras iguais com índices iguais não diferem entre si ($P > 0,01$, t de Student). O teste foi realizado utilizando-se 5 folhas por genótipo.....61

Figura 18 – Altura média na antese. A) *Pts Sp BC₆F_n* *versus* MT *Sp BC₆F_n*. B) MT *versus* Elite 157 BC₃F₃ (*gdw gdw*) e Elite BC₄ (*Gdw gdw*). C) MT *Sp BC₆F_n* *versus* MT. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,01$, t de Student). No teste foram feitas 30 repetições por genótipo.....63

Figura 19 – Germinação de sementes de genótipos contrastantes, avaliados a cada 24 horas. Foram feitas 3 repetições para cada genótipo sendo cada repetição composta por 50 sementes. A) MT *versus* MT *Sp* BC₆F_n. B) MT *Sp* BC₆F_n *versus* *Pts Sp* BC₆F_n. C) Elite 157 BC₃F₃ (*gdw*) *versus* MT mostrando taxas de germinação não alteradas na presença de *gdw*. Os asteriscos indicam que as médias diferem entre si pelo teste *t* com (**: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$).....65

Figura 20 – Segregação de altura e recorte foliar em 277 plantas BC₄F₂. A) Distribuição de plantas com alturas menores e plantas com altura maiores ou iguais a 8 cm. B) Distribuição de plantas com folhas recortadas (R) e não recortadas (NR). Valores χ^2 não significativos indicam segregação 3:1.....66

Figura 21 – Fenótipo das folhas representativas para recorte foliar. Da esquerda para a direita: *gdwgdw* BC₃F₃, MT, MT *Sp* BC₆F_n e *Pts Sp* BC₆F_n.....67

Figura 22 – Esquema representativo dos genes avaliados e as respostas fisiológicas por eles afetadas. Setas indicam promoção da resposta e símbolo “T” indicam inibição. Os efeitos representados aqui são relativos aos alelos presentes em *S. galapagense*.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de espécies com a nomenclatura <i>Lycopersicon</i> e suas respectivas denominações como <i>Solanum</i> , a mais freqüentemente adotada e aceita atualmente (Adaptado de SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005).....	24
--	----

1 INTRODUÇÃO

Analogamente à espécie *Arabidopsis thaliana*, a cultivar miniatura de tomateiro *Solanum esculentum* L. cv Micro-Tom (MT) tem sido cada vez mais utilizada como planta modelo para estudos com abordagens relacionadas à genética e fisiologia do desenvolvimento. A vantagem extra sobre o conhecido modelo *Arabidopsis* reside no fato da importância agrônômica do tomateiro. Assim, este pode, por exemplo, ser utilizado em pesquisas acerca de arquitetura foliar (HAREVEN et al., 1996), dominância apical (SCHUMACHER et al., 1999), abscisão de órgãos (MAO et al., 2000), amadurecimento de frutos (VREBALOV et al., 2002), estudos de metabolismo secundário (WILLIAMS et al., 1980; RONEM et al., 2000; ISAACSON et al., 2002), transporte no floema (KIM et al., 2001), metabolismo hormonal em plantas e transdução de sinais (IMBER; TAL., 1970; HICKS et al., 1989., WILKINSON et al., 1995). Além disso, MT possui características peculiares e fundamentais para seu uso em pesquisas. Possui porte reduzido (aproximadamente 8 cm se cultivados em vasos não maiores que 100 ml) e ciclo rápido (70-90 de semente a semente), já que foi inicialmente selecionado para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989). Assim como todas as outras cultivares de tomateiro, MT é considerado um diplóide verdadeiro e possui genoma pequeno (950 Mb e cerca de 35.000 genes), o que facilita a obtenção de mutantes nesta espécie (PINO-NUNES et al., 2009).

Essas vantagens obtidas utilizando MT motivaram nossa equipe do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCHDV), sediado na ESALQ/USP, em Piracicaba, a adotar essa cultivar como modelo para uma abordagem genética de questões fisiológicas. Em posse da cv MT e sua ampla gama de mutações dominantes e recessivas afetando o desenvolvimento das plantas (PINO-NUNES et al., 2009), foi proposto um estudo inédito, neste caso visando basicamente entender a natureza de características pontuais observadas em uma determinada espécie selvagem relacionada ao tomateiro denominada *Solanum galapagense* S. Darwin & Peralta. Esta espécie, originária das Ilhas Galápagos, possui três características marcantes e facilmente perceptíveis. A primeira delas é em relação ao curto entrenó. A segunda característica observada é o recorte típico de suas folhas. A natureza desta característica já foi descrita, sendo seu principal componente a ação do alelo *Petroselinum* (*Pts*) (RICK, 1980). Finalmente, a terceira característica é a dormência das sementes. Hoje é sabido que esta ocorre por questões evolutivas, de modo que a planta agregou a característica no sentido

do fruto poder ser fonte de alimento para jabutis endêmicos da Ilha, para então, após a passagem pelo trato intestinal dos animais a dormência ser quebrada e estas sementes serem dispersas por estes répteis (RICK; BOWMAN, 1961). Coincidentemente, as três características descritas também são notadas naqueles mutantes com deficiência ou com pouca sensibilidade ao hormônio giberelina (GA).

Até os dias atuais não são conhecidas variações genéticas naturais em tomateiro que levem a alteração, no nível endógeno ou na sensibilidade a giberelinas. Assim, a meta principal do trabalho era buscar a resposta para a ocorrência simultânea das características descritas em *S.galapagense*. Inicialmente, imaginou-se que o comprimento do entrenó pudesse ser uma oportunidade de recrutar o gene que levasse ao nanismo de plantas. Desta forma, isto representaria interesse agrônômico, já que o nanismo provocado por mutações não muito severas afetando GA, já provou ser útil para agricultura (SILVERSTONE; SUN, 2000).

A forma adotada para execução dos experimentos foi baseada na principal vantagem oferecida pelo modelo MT, que é a facilidade de cruzamento com outros genótipos de tomateiro ou mesmo de espécies selvagens, e posterior triagem das plantas contendo caracteres morfológicos de interesse (PINO-NUNES et al., 2009).

Ao fim dos trabalhos experimentais foi possível alcançar a geração BC₆, sendo as gerações anteriores amplamente caracterizadas em relação a respostas como germinação, porte e recorte foliar. Este feito foi especialmente conclusivo a partir de BC₃F₃, já que a partir desta geração é possível contar populações definidas em termos de segregação para os caracteres morfológicos em questão, fundamentais para a realização de todos os experimentos da dissertação.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A importância da variação genética natural para estudos fisiológicos

Em abordagens de estudos genéticos e funcionais das plantas, a produção de mutantes é um foco constantemente trabalhado. Especificamente em tomateiro esta prática é fortemente requerida tanto em estudos visando abordagens genéticas, quanto fisiológicas e morfológicas. Para isso, o tomateiro pode ter a mutagênese induzida pelo uso de agentes físicos (DAVID-SCHWARTZ et al., 2001; LI et al., 2004), ou químicos (MEISSNER et al., 1997), ou pela inserção de elementos de transposição (MEISSNER et al., 2000). Entretanto, a mutagênese possui um grande limitante quando se trata de genes cuja planta modelo já apresenta alelos nulos, o que dificulta entender a função desses genes (ALONSO-BLANCO; KOORNNEEF., 2000). Para esses casos a alternativa mais apropriada é a variação genética natural. Esta abordagem se concentra em buscar aquelas variações alélicas que foram selecionadas na natureza. Além disso, quando a variação genética é natural, ao invés de mutantes e transgênicos, há a vantagem adicional de provavelmente possuir valor adaptativo. A associação de variação genética natural com hormônios vegetais seria a maneira mais direta para se demonstrar que estas moléculas foram recrutadas ao longo da evolução das espécies, como as do gênero *Solanum* seção *Lycopersicum*.

O patrimônio genético das várias espécies presentes na natureza contém variações alélicas em muitos genes diferentes (efeito quantitativo), sendo esta fonte de mutações o oposto do que se constata quando há indução de mutação. No caso de mutantes induzidos não são esperadas variações quantitativas, desde que haja uma seleção prévia para buscar genótipos homogêneos. A natureza quantitativa da herança é uma grande desvantagem, sendo um fator limitante em pesquisas básicas de fisiologia, embora muitas vezes a variação natural seja frequentemente usada em melhoramento. Além disso, o processo de seleção natural pode gerar genótipos adaptados a ambientes específicos. Esta adaptação, provavelmente reflete variações em traços ecológicos e fisiológicos, embora a morfologia também possa diferir muitas vezes dentro da própria espécie, o que é evidente em coleções de plantas cultivadas (KOORNNEEF et al., 1997).

Estas fontes de variação, especialmente aquelas relatadas para características fisiológicas não têm sido muito acessíveis para análises genéticas e, muito menos, para análises genéticas moleculares, uma vez que tais propriedades comportam-se como características quantitativas, determinadas pelos *QTLs* (*Quantitative Trait Loci*), implicando em herança poligênica e efeitos ambientais sobre a expressão da característica. Uma série de avanços genéticos, como progressos no uso da tecnologia dos marcadores (RAFALSKI; TINGEY, 1993) e melhorias nas abordagens estatísticas permitiram que as características em estudo ficassem cada vez mais acessíveis permitindo a detecção de *locus* responsáveis por variações genéticas em diversos caracteres (JANSEN, 1996).

2.1.2 *Solanum galapagense*

As plantas pertencentes à família *Solanaceae* são de extrema importância, seja no âmbito da agricultura (produção de hortícolas como tomates, batatas, berinjelas, jiló e pimentas), na medicina (cultivo de medicinais como a mandrágora, o tabaco, a beladona), ou como ornamentais (algumas espécies de *Solanum*, tabaco e petúnias). Os membros da família *Solanaceae* ocorrem em todo o mundo, porém as maiores diversidades são vistas nos Neotrópicos. O mais amplo gênero da família é *Solanum*, o qual conta com cerca de 1500 a 2000 espécies. Esta diversidade de espécies coloca o gênero como um dos mais ricos em número de espécies de angiospermas. As espécies de *Solanum* exibem uma ampla variedade morfológica, abrangendo desde minúsculas ervas até espécies florestais de porte maior, que são encontradas em todos os habitats do mundo.

A classificação de tomateiros como sendo do gênero *Lycopersicum* foi mantida por vários botânicos clássicos (DUNAL, 1813, 1852; MULLER, 1940; LUCKWILL, 1943; CORRELL, 1962; SYMON, 1981; D'ARCY, 1991; NEE, 1999; HUNZIKER, 2001), sendo que até mesmo os produtores adotaram esta nomenclatura (TAYLOR, 1986; RICK, 1979, 1988; RICK et al., 1990; C.M.RICK. Tomato Genetics Resource Center. <http://tgrc.ucdavis.edu>). Esta denominação, entretanto, não foi universal. Linnaeus (1753), importante e renomado taxonomista, reconheceu e incluiu o tomateiro no gênero *Solanum*, e não como *Lycopersicon* (WETTSTEIN, 1891; MACBRIDE, 1962; SEITHE, 1962; FOSBERG, 1987; CHILD, 1990). Atualmente esta nomenclatura tem sido cada vez mais utilizada dentro do meio científico, principalmente devido à proximidade genética existente de *Lycopersicum* com o gênero *Solanum* (PERALTA; SPOONER, 2000, 2001).

Como dito anteriormente, existem várias espécies dentro do gênero *Solanum*, sendo nove destas mais próximas do tomateiro doméstico (*Solanum lycopersicum* L. syn. *Lycopersicon esculentum*. Mill). Para fins didáticos é listada a seguir a denominação primeiramente conhecida como *Lycopersicon* e a adotada atualmente *Solanum*.

Tabela 1 – Lista de espécies com a nomenclatura *Lycopersicon* e suas respectivas denominações como *Solanum*, a mais frequentemente adotada e aceita atualmente (Adaptado de SPOONER; PERALTA; KNAPP, 2005)

Nomenclatura antiga (<i>Lycopersicon</i>)	Nomenclatura atual (<i>Solanum</i>)
<i>L.esculentum</i> Mill.	<i>S.lycopersicum</i> . L.
<i>L.cheesmaniae</i> f. <i>minor</i> (Hook.f.)	<i>S. galapagense</i> S.Darwin & Peralta
<i>L.cheesmaniae</i> L. Riley	<i>S. cheesmaniae</i> (L.Riley) Fosberg
<i>L.chilense</i> Dunal	<i>S.chilense</i> (Dunal) Reiche
<i>L.pennellii</i> (Correll) D'Arcy	<i>S.pennellii</i> Correll
<i>L.peruvianum</i> (L). Mill	<i>S.peruvianum</i> L. s. 1
<i>L.pimpinellifolium</i> (L) Mill	<i>S.pimpinellifolium</i> L.
<i>L.hirsutum</i> Dunal	<i>S. habrochaites</i> S. Knapp & D. N Spooner
<i>L.parviflorum</i> C.M.Rick, Kesick, Fobbes & Holle	<i>S.neorickii</i> D.M.Spooner, G.J.Andreson & R.K.Jansen
<i>L.chmielewskii</i> C.M.Rick, Kesicki, Fobes & Holle	<i>S.chmielewskii</i> (C.M.Rick, Kesiki, Fobes & Holle), D.M.Spooner, G.J.Anderson & R.K.Jansen

Por terem se desenvolvido numa ampla gama de latitudes e habitats, abrangendo desde regiões ao sul do Equador até o norte do Chile, estas condições climáticas variadas contribuíram ainda mais para o surgimento da diversidade no gênero. Um bom exemplo para fins comparativos é o contraste observado entre as condições de cultivo da espécie *S.pennelli* syn. *L.pennelli* D'Arcy, capaz de sobreviver em áreas desprovidas de chuvas e contando com um sistema radicular pobre, *S. galapagense*, a partir da qual se iniciou os primeiros estudos do presente trabalho, capaz de crescer em áreas inundadas por água do mar, das Ilhas Galápagos (TAYLOR, 1986).

Esta espécie *S.galapagense* é originária das Ilhas Galápagos, região vulcânica situada a cerca de 1000 km da costa oeste da América do Sul, na República do Equador. As ilhas mais antigas do arquipélago datam de 2 a 6,5 milhões de anos (GEIST, 1996). As ilhas mais novas ainda possuem atividade vulcânica, sendo registrado, apenas em Ferdinanda entre 1958 e 1998, um total de sete erupções. Nas Ilhas Galápagos existem 13 ilhas maiores, isto é, com mais de 10 km² e mais de 40 menores, comumente chamadas de ilhas menores, ilhotas ou rochas emergentes. A superfície total das Ilhas é em torno de 8000 km² (DARWIN et al., 2003).

presença da mutação *Pts* ou *Petroselinum* (em alusão ao nome científico da salsa que também apresenta folhas recortadas), que foi descrita pela primeira vez por Rick, em 1980, e que hoje já se sabe que é uma variação genética natural presente nesta espécie. É interessante destacar que as três características fenotípicas acima descritas são observadas em mutantes de tomateiro deficientes no hormônio giberelina (KOORNNEEF et al., 1990; BENSEN; ZEEVAART, 1990).

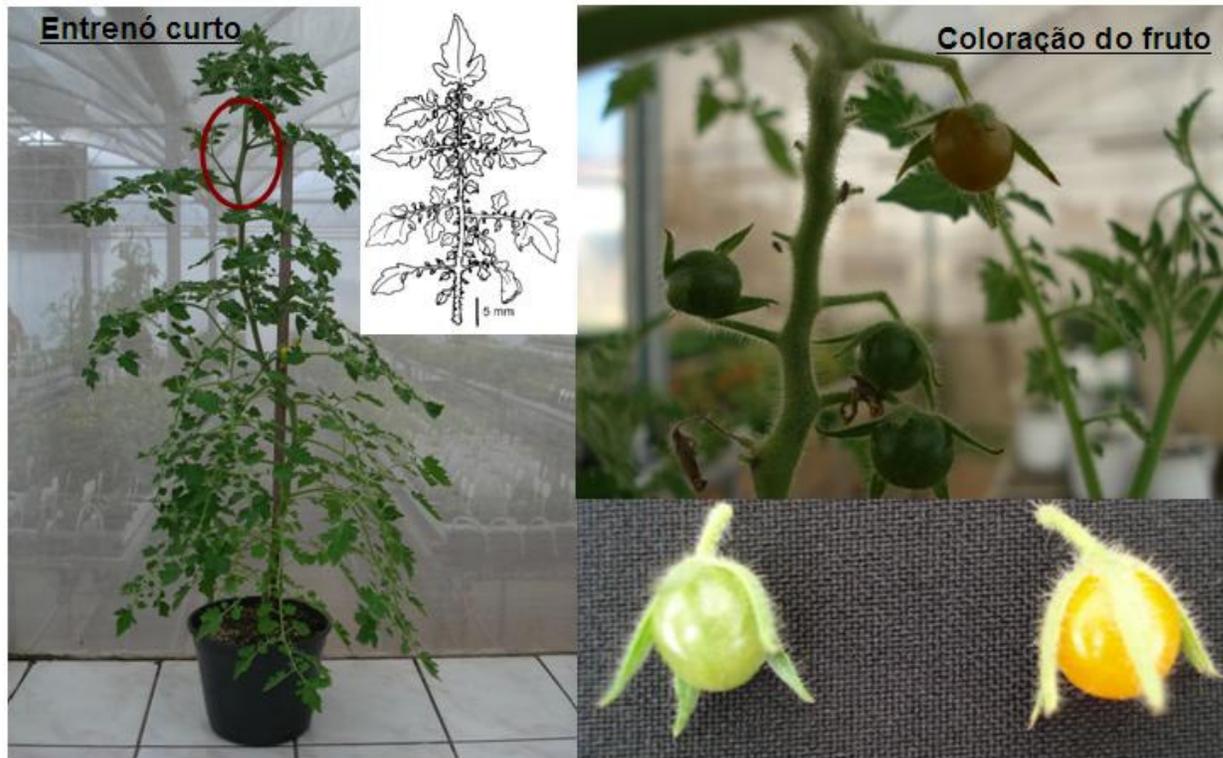


Figura 2 – Fenótipo de *Solanum galapagense*. Em destaque entrenó curto, folha com típico recorte acentuado e coloração dos frutos nas fases de pré - maturação e na maturação (Fonte: Arquivo Pessoal)

2.1.3 Giberelinas

As funções chave que as giberelinas (GAs) desempenham no desenvolvimento vegetal são claramente observadas quando são estudados mutantes deficientes nesta classe hormonal, os quais em geral são anões e de germinação comprometida. Trata-se de uma classe hormonal capaz de modular o desenvolvimento da planta ao longo de todo seu ciclo de vida. Nos primeiros estudos, que se iniciaram por volta dos anos 50, a altura de mutantes anões de plantas de ervilha e

milho era recuperada após a aplicação de ácido giberélico (GA_3), o qual era obtido a partir de culturas do fungo *Gibberella fujikuroi*, que provocava crescimento anormal em plantas de arroz, pesquisa esta iniciada em 1920 por um grupo de japoneses. Esta foi a primeira indicação de que GAs eram reguladores endógenos do crescimento de plantas (PHINNEY, 1983). Esta suposição foi confirmada após a constatação de que extratos vegetais também poderiam estimular o crescimento dos mutantes. Mais tarde esta informação foi confirmada pela identificação química de GAs em plantas superiores.

Na década de 50 foi elucidada a estrutura química das GAs, o que foi o principal parâmetro para sua classificação. Um importante aspecto das GAs é o fato destas serem definidas por sua estrutura química, sendo todas derivadas de uma estrutura inicial chamada *ent*-caureno (figura 3 A) e classificadas quimicamente como diterpenóides (C₂₀) constituídos de quatro unidades de isopreno (C₅), sendo que a nomenclatura recebida segue a ordem de descoberta e identificação, independentemente de sua origem. Existem dezenas de GAs, porém poucas são biologicamente ativas. As mais comuns em vegetais são a 1, 4 e 7 (e 3 em microorganismos), cuja estrutura química é mostrada nas figuras 3 B e 3 C.

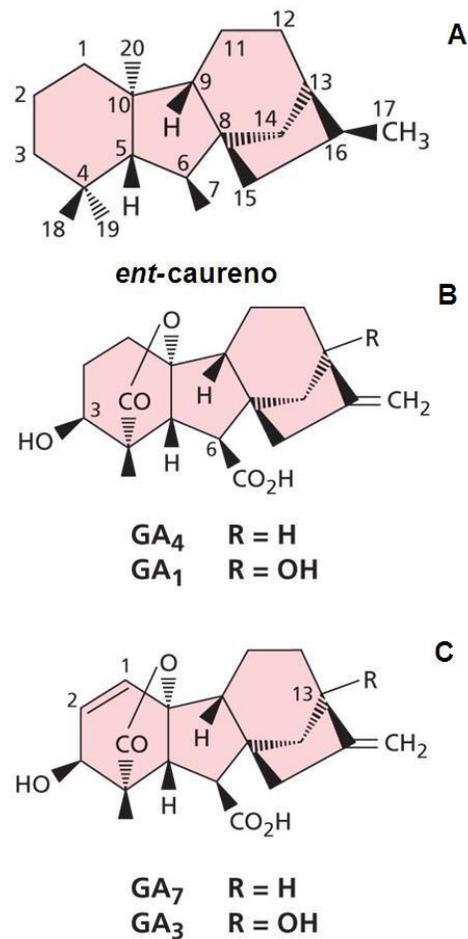


Figura 3 – Estrutura do anel *ent*-caureno (A). Estrutura de GA₁ e GA₄ (B) e GA₃ e GA₇ (C), exemplificando os tipos de GAs dependendo do radical ligado ao carbono

As principais vias de formação e catabolismo de GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ são mostradas na figura 4. De maneira simplificada, o processo de biossíntese de GA é constituído por três etapas básicas, que acontecem em diferentes compartimentos da célula. O primeiro passo ocorre nos plastídeos e caracteriza-se pela síntese de *ent*-caureno (Figura 4 A), mediada por enzimas ciclases. Em seguida, no segundo compartimento que é o retículo endoplasmático, o *ent*-caureno é oxidado, por monoxigenases dependentes de citocromo p450, formando GA₁₂, precursora geral das GAs (figura 4 B). Por fim, a terceira etapa acontece no citosol, de maneira que GA₁₂ é convertida em diferentes tipos de GA (figura 4 C). Essa última etapa é mediada por dioxigenases, sendo as mais importantes a GA₂₀ oxidase (GA₂₀ ox), a qual produz GA₂₀, e a GA₃ oxidase (GA₃ ox), a qual transforma GA₂₀ em GA₁, a principal GA ativa. Uma outra dioxigenase bastante

importante é GA₂ oxidase (GA₂ ox), a qual inativa diferentes tipos de GA pela adição de um hidroxila (OH) na posição 2 mostradas na figura 3 A.

Sementes, frutos em desenvolvimento e alguns tecidos vegetativos são os locais principais de biossíntese de GA em plantas superiores.

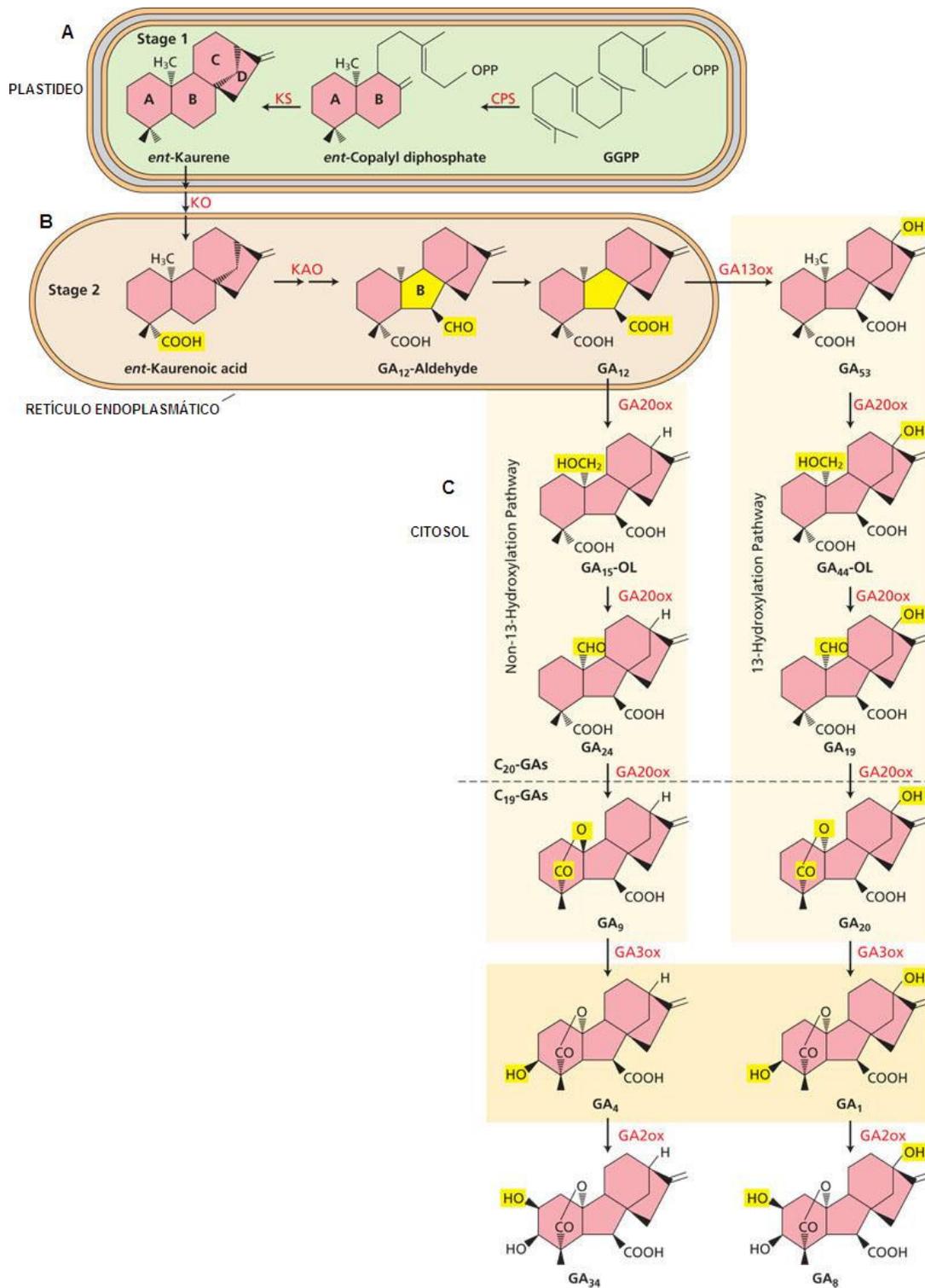


Figura 4 – Estágios da biossíntese de GA. (A) Primeira etapa, nos plastídeos, em que há síntese de *ent*-caureno. (B) No retículo endoplasmático esta estrutura sofre oxidação formando o precursor das GAs. (C) Conversão deste precursor (GA_{12}) em GAs. (Modificado de TAIZ; ZEIGER (2004) In: Fisiologia Vegetal)

2.1.4 Micro-Tom como modelo genético

Inicialmente, a cultivar Micro-Tom (MT) (*Solanum lycopersicum* L. cv. MT) foi produzido para fins ornamentais, apresentando fenótipo anão e frutos vermelhos e pequenos (SCOTT; HARBAUGH, 1989). Em 1997, Meissner et al., propôs o uso da cultivar MT como modelo para o estudo de genética em plantas, tal qual já era feito em *Arabidopsis thaliana*. O porte pequeno (cerca de 8 cm), ciclo curto (70 a 90 dias) e facilidade de transformação levaram esta cultivar a ser adotada como um modelo conveniente para pesquisas (MEISSNER et al., 1997; EMMANUEL; LEVY, 2002). Tem sido sugerido, com base na sua genealogia, que o fenótipo de MT é resultado do efeito maior de, ao menos duas mutações recessivas: *dwarf* (*d*) e *miniature* (*mnt*) (MEISSNER et al., 1997). Em testes de alelismo já foi confirmado que MT carrega a mutação *dwarf* (LIMA et al., 2004). Atualmente já se sabe que a mutação *dwarf* pertence à via de biossíntese de brassinoesteróides (BISHOP et al., 1999), o que significa que MT possui baixos níveis nesta classe hormonal, porém não sendo considerada uma mutação drástica para deficiência ou insensibilidade a este hormônio. É fundamental esclarecer que apesar de não ser conhecida ao certo a natureza da mutação *mnt*, MT não é deficiente ou insensível a GA. Este dado é confirmado pelo fato de a cultivar não apresentar qualquer tipo de alteração em níveis endógenos do hormônio (MARTÍ et al., 2006), o que o diferencia drasticamente dos mutantes de tomateiro neste hormônio (KOORNNEEF et al., 1990).

O fenótipo de crescimento determinado de MT sugere que também tenha uma mutação em *SP* (*SELF PRUNING*), cujo alelo recessivo leva a uma conversão de todo o meristema vegetativo em floral, interrompendo o crescimento simpodial do tomateiro (PNUELI et al., 1998). Trabalhos realizados em nosso laboratório permitiram isolar, no background da cultivar MT, o alelo selvagem *Sp*, que causa o crescimento indeterminado em plantas (figura 5).



Figura 5 – Fenótipo de MT (*spsp*), à direita, e MT *Sp* BC₆F_n (à esquerda)

O gene *SP* pertence a uma família de genes regulatórios denominados CETS que codificam proteínas modulatórias capazes de determinar o potencial para crescimento contínuo do meristema apical caulinar (PNUELI et al., 2001). Desta forma, este gene controla o processo pelo qual os meristemas vegetativos e reprodutivos alternam no meristema simpodial do tomateiro.

Hoje MT é amplamente conhecido, consagrando-se como modelo cada vez mais empregado para pesquisas em todo o mundo. No Brasil, a maior coleção de germoplasma desta cultivar e seus mutantes hormonais pertence à ESALQ/USP. Desta forma, do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, no qual foi desenvolvido este trabalho, diversos estudos já foram realizados. Dentre estes, pode-se destacar estudos abrangendo obtenção de mutantes hormonais através da indução de mutação (PINO-NUNES et al., 2009), uso de mutantes fotomorfológicos (CARVALHO, 2007), esclarecimento e descrição de variações genéticas naturais (PIOTTO, 2008), emprego de mutantes no controle a herbivoria (CAMPOS, 2009), estudos de regeneração *in vitro* (LIMA et al., 2004) e interações hormonais.

Dentre os mutantes em GA de tomateiro, destacam-se *gib1*, *gib2*, *gib3*, série que contém baixos níveis de GA e que por isso apresentam plantas com entrenós curtos, além de folhas encarquilhadas e baixas taxas de germinação (BENSEN; ZEEVAART, 1990). Esses mutantes estão mapeados nos cromossomos 6 (*gib1*), 1 (*gib2*) e 7 (*gib3*) (KOORNNEEF et al., 1990). Já *procera* (*pro*), mapeado no cromossomo 11 (VAN TUINEN et al., 1999), por ser um mutante de resposta constitutiva a GA, apresenta maior altura e folhas com bordos praticamente sem recorte foliar. Estas características principais desde mutante são típicas dos efeitos provocados pela aplicação de GA. Além destes, há mutantes em outras classes hormonais, como em auxinas (*dgt*, HICKS et al., 1989), citocininas (*brt*, PINO-NUNES, 2005), etileno (*Nr* e *epi*, FUJINO et al., 1988; WILKINSON et al., 1995), ácido abscísico (*sit*, *flc*, e *not*, TAYLOR et al., 2000; BURBIDGE et al., 1999), brassinoesteróides (*cu3* e *dpy*, BISHOP et al., 1999; KOKA et al., 2000; MONTROYA et al., 2002) e em ácido jasmônico (*def1* e *jai1*, HOWE et al., 1996, 1999; LI et al., 2001).

2.2 Objetivos

Sucintamente, o presente trabalho teve como objetivo principal entender as bases genéticas do nanismo, dormência de sementes e arquitetura foliar presentes em *S.galapagense*, e verificar se essas características estavam relacionadas com possíveis variações genéticas naturais no hormônio giberelina.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Infra-estrutura

2.3.1.1 Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCHDV)

Parte das atividades foi desenvolvida no Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCHDV) pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas (LCB) da ESALQ/USP e que está sob a supervisão do Professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres. O laboratório contava com recursos como sala de crescimento e a coleção do germoplasma de diversos mutantes hormonais de tomateiro.

2.3.1.2 Casa de Vegetação

Trata-se de uma estrutura climatizada, cuja temperatura gira em torno dos 28 °C e o controle da mesma era realizado periodicamente. A irrigação dos vasos era automatizada, sendo necessária a irrigação manual somente quando relatado alguma falha em algum dos gotejadores. Tanto o tempo de irrigação quanto o número de vezes a irrigar por dia já eram pré-estabelecidos de forma a suprir as necessidades de água das plantas. A casa contava ainda com um sistema de ventilação (figura 6) pré-programado que era acionado por termostato.



Figura 6 – Estrutura de cultivo das plantas em casa de vegetação. Em destaque detalhes do sistema de irrigação e ventilação

2.3.2 Semeadura e cultivo

As sementes a serem testadas eram distribuídas regularmente em bandejas contendo uma mistura comercial de Plantmax HT Eucatex e vermiculita, na proporção de 1: 1, suplementado com 1g de NPK 10:10:10, e calcário dolomítico (Ca + Mg) na proporção de 4g por litro de mistura. As mudas eram transplantadas no momento da formação do primeiro par de folhas verdadeiras, o que ocorria por volta de 15 a 20 dias após a semeadura, e preferencialmente realizados nas horas mais frescas do dia para que fosse evitada a dessecação. Desta forma, as plântulas eram transplantadas para vasos de 150 ml. Neste momento era realizada a adubação com cerca de 0,2 g de NPK, sendo esta refeita periodicamente. Os vasos possuíam etiquetas em que constavam informações como genótipo e geração, data de semeadura e nome do responsável pelo material.

2.3.3 Cruzamentos e / ou retrocruzamentos

Para a realização dos retrocruzamentos (RC`s) ou backcrosses (BC`s) previamente definia-se quem seria o parental doador e o recorrente, de forma que o doador era semeado cerca de uma semana antes. Assim, usualmente o momento da antese dos parentais doadores coincidia com a formação dos primeiros botões florais maduros prontos para serem emasculados, isto é, com as sépalas abertas e pétalas fechadas (figura 7). Com o auxílio de uma pinça era feita a emasculação, ou seja, a remoção do cone de anteras de forma a deixar exposto o estilete da flor com o estigma prontamente viável a receber o pólen da planta doadora, procedimento este realizado preferencialmente do dia seguinte e em horário mais fresco. Os botões que recebiam o pólen tinham algumas das sépalas removidas, no sentido de identificar as flores cruzadas no momento da colheita dos frutos. Por fim, para evitar o surgimento de pontos de dreno eram removidos os botões florais menores e mais recentes, o que de certa forma aperfeiçoava a formação dos demais frutos.

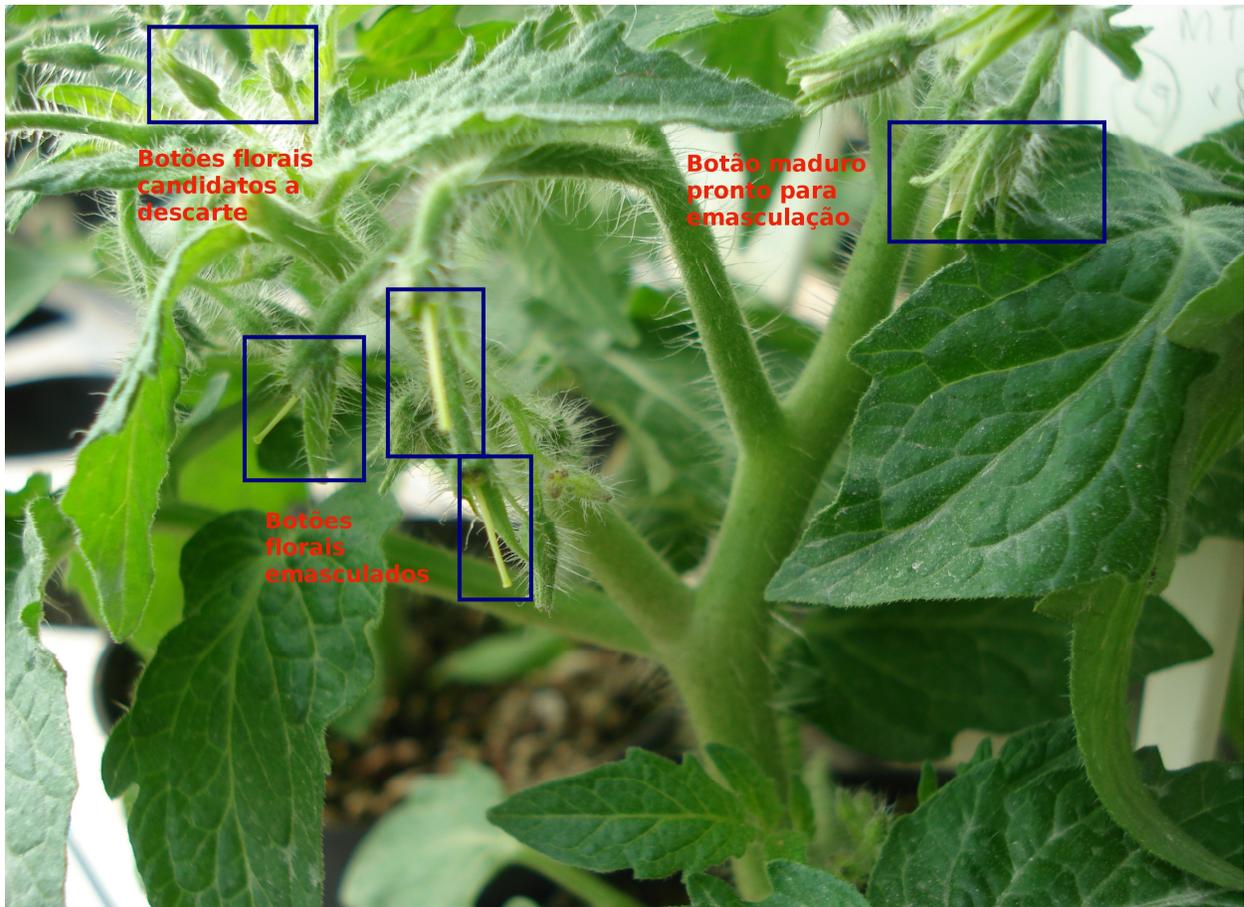


Figura 7 – Detalhe dos botões florais aptos à emasculação, botões emasculados em que algumas de suas sépalas são removidas no momento do procedimento de emasculação e botões mais recentes candidatos a serem removidos da planta

2.3.4 Colheita e processamento dos frutos

A metodologia empregada para colheita dos frutos, tanto aqueles provindos de cruzamentos quanto os oriundos de autofecundação era a mesma. Cerca de 70 dias após a semeadura, em geral, era possível obter frutos no momento propício para a colheita, isto é, maduros porém não exageradamente. Este procedimento não só evitava a possível germinação de sementes no interior dos frutos como também favorecia a adoção de um padrão, visto que muitas das sementes coletadas, especialmente neste trabalho passavam por avaliações posteriores, como de taxas de germinação. Após a colheita, os frutos eram então processados, etapa simples e que

consistia em repartir o fruto e remover as sementes. O conteúdo obtido era composto pela semente mais a mucilagem típica que envolve a semente, sendo estes colocados em copos de plástico contendo cerca da metade do copo com água e uma pitada de fermento biológico. Era feita a devida identificação do genótipo e geração no copo e por volta de 24 horas depois este conteúdo era despejado numa peneira onde se lavava com água corrente. A prática do uso do fermento favorecia não somente a retirada da camada de mucilagem que envolvia a semente, mas auxiliava na prevenção fitopatológica evitando a transmissão de patógenos por sementes, como o *TMV (Tomato Mosaico Vírus)*. As sementes eram espalhadas em papel sulfite e deixadas em bancadas na própria casa de vegetação para secarem naturalmente. Após secas eram retiradas com auxílio de uma régua e então armazenadas na geladeira.

2.3.5 Estocagem das sementes

A estocagem das sementes de uso comum ao grupo era feita em envelopes de papel alumínio os quais posteriormente eram levados ao nosso banco de germoplasma e armazenados na geladeira, devidamente identificados. Especialmente em casos específicos como o do presente trabalho nos quais determinados genes ainda não estavam fixados as sementes eram provisoriamente mantidas da mesma forma (em envelopes de papel alumínio), porém em recipiente isolado. Apenas após a confirmação do(s) genótipo(s) este material era disponibilizado ao banco de germoplasma do grupo, o qual era incluído na listagem controle de todos os genótipos e espécies por nós mantidas.

2.3.6 Teste de germinação

Para testar a germinação das sementes adotou-se o protocolo utilizado em nosso grupo em experimentos anteriores não somente por revelar resultados coerentes, mas também por permitir que eventuais tipos de contaminações por fungos, por exemplo, ocorressem. Este teste permitia entender a dormência característica provinda de *S. galapagensis*. Eram utilizados três repetições para cada genótipo, sendo que cada uma das repetições (cada um dos gerboxes escuros) continham 50 sementes. Os gerboxes eram forrados com papel filtro previamente esterilizados. Cerca de cinco folhas do papel eram suficientes para comportar as sementes e manter a umidade

adequada. Antes de serem colocadas para germinar as sementes eram desinfestadas em hipoclorito de sódio (HClO) a 5 % acrescido de 2 gotas de detergente e mantidas sob agitação durante 5 minutos. Após este procedimento, com o auxílio de uma peneira escoava-se este conteúdo lavando abundantemente com água destilada. As sementes eram espalhadas aleatoriamente com espaço suficiente para seu desenvolvimento sob o papel filtro previamente umedecido com água destilada. Nos casos em que a solução de embebição era hormônio, este substituía a água destilada e então o hormônio era aplicado da mesma maneira que no tratamento com a água destilada. As avaliações eram feitas em tempos pré-determinados, geralmente feitos a cada 24 horas, ou em certos casos com intervalos de 12 horas. A aplicação de água destilada era feita baseada na umidade do papel filtro, de forma a mantê-lo, porém não encharcado para permitir a respiração das sementes. Os trabalhos eram dados como finalizados após cerca de cinco dias de avaliação. Era calculada a média de sementes germinadas e estes dados eram organizados em gráficos que explicavam a taxa média de germinação ao longo do tempo.

2.3.7 Avaliação de altura

As avaliações das alturas das plantas eram realizadas sempre no momento da antese com o auxílio de uma régua. A medida considerada era aquela entre a inserção do primeiro par de cotilédones até a primeira flor aberta. Nas triagens para plantas baixas eram utilizadas de 200 a 300 plantas e em testes de caracterização de genótipos utilizavam-se cerca de 15 a 20 plantas por genótipo. As plantas ao serem etiquetadas recebiam numeração individual, o que permitia a caracterização de cada uma das plantas, ainda que pertencentes ao mesmo genótipo e geração. As alturas eram registradas em uma planilha e estes dados otimizavam as avaliações no sentido de permitir a seleção das plantas portadoras do fenótipo buscado no determinado experimento e possibilitar o descarte daquelas plantas desnecessárias no prosseguir dos trabalhos. Plantas que apresentavam características atípicas, ou mesmo as que aparentemente apresentavam algum tipo de deficiência nutricional eram eliminadas e não consideradas nos testes.

2.3.8 Curvas de dose-resposta hormonal

Foi elaborado um teste com os genótipos *pro*, MT, *gib3* e BC₁F₄ cujo objetivo foi verificar o comportamento da altura sob diferentes dosagens de GA₃. Para isto as sementes foram plantadas como de costume em bandejas em casa de vegetação e após aproximadamente 15 dias elas foram transplantadas para vasilhinhos individuais. O total de plantas para cada genótipo era de 16. As soluções foram previamente preparadas no laboratório e conservadas em frascos de vidro na geladeira mantida na casa de vegetação. As avaliações foram feitas a partir do momento do transplante das mudas para os vasos, a cada 2 dias e a altura considerada era tomada a partir da inserção do par de cotilédones até o meristema apical caulinar. A duração do teste estendeu-se por aproximadamente 36 dias, sendo que a aplicação de ácido giberélico era realizada a cada 7 dias sempre no período da manhã. Vale destacar o cuidado tomado em relação a erros que poderiam ser causados por deriva de hormônio para outras plantas. Para tal, a dose 0 era sempre colocada no início do fluxo da água da irrigação, seguindo a ordem crescente de concentrações.

Para o preparo da solução de 1mM de GA₃ diluiu-se 3,46 g de ProGib 10 % em 1 L de água destilada sendo este produto a solução estoque. A partir da mesma eram feitas as diluições para obtenção das concentrações: 10, 50, 100 e 500 µM de GA₃, além da solução controle contendo apenas água destilada. As soluções eram guardadas em frascos de vidro devidamente identificados armazenados em geladeira.

2.3.9 Avaliação do índice de recorte foliar

O protocolo para avaliar o recorte foliar foi estabelecido pelo grupo a partir do presente trabalho. Até então as avaliações eram feitas baseadas em visualizações feitas das imagens das folhas obtidas através de um *scanner*. Devido à carência de variáveis que permitissem a atribuição de valores foi elaborado o hoje fixado protocolo de índice de recorte foliar com base na razão entre área e perímetro foliares. As imagens permaneceram como caractere a ser considerado visto que em alguns casos são claramente notáveis diferenças morfológicas, porém não acusadas em testes estatísticos. Desta forma, eram escolhidas folhas de plantas com o mesmo padrão de desenvolvimento fisiológico no momento da antese e destacando-se a quarta folha, a contar a partir da inserção do primeiro par de cotilédones. Eram escaneadas três folhas com seus

respectivos folíolos logo após elas serem destacadas da planta de origem. Destacava-se cada parte componente das folhas, ou seja, seus folíolos (geralmente um total de 5) e o pecíolo, optando pelo tom branco e preto e resolução de 300 dpi. Era obtida uma imagem no formato TIF, como mostrada na figura 8 (MT). Esta imagem era, por sua vez, aberta pelo *software* Quant V.1.0.1 (VALE et al, 2001), usado em análise de imagens, e desenvolvido para quantificar severidade de doenças de plantas. Foi por nós usado para obter dados de área (cm²) e perímetro (cm) foliar. Estabeleceu-se como sendo o índice de recorte foliar a razão da média entre a área e o perímetro foliar. Para a interpretação final avaliou-se o valor numérico entre a razão média final de tal sorte que informações como homogeneidade dos dados, valor do numerador (área) e do denominador (perímetro) eram criteriosamente estudados. Estas considerações aprimoraram a acurácia do trabalho visto que o ambiente pode interferir fortemente em caracteres morfológicos. Além disso, foram tomadas plantas de mesma idade fisiológica e na antese das mesmas.



Figura 8 – Modelo gráfico obtido pelo *scanner* para a leitura de área e perímetro no *software* Quant. Neste exemplo trata-se da imagem de folha de MT

2.3.10 Registros fotográficos

Sempre que necessário recorreu-se ao recurso de fotografar plantas em casa de vegetação, sementes em germinação e outros atributos julgados importantes para o trabalho.

2.3.11 Análise estatística

Ainda que a abordagem de caracteres morfológicos deste trabalho tenha sido baseada principalmente em registros fotográficos ou imagens, foram feitos testes estatísticos. Estes testes contribuíram de forma complementar às análises de imagens, de forma a oferecer informações que auxiliaram em conclusões quando obtidos resultados dúbios. Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada cujo número de tratamentos e repetições variavam conforme o tipo de experimento. Para as análises dos dados utilizou-se o *software* Assistat, que faz análise de variância e classificação de médias e que foi desenvolvido pelo professor Dr. Francisco de Assis do Centro de Tecnologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

2.4 Resultados

2.4.1 Obtenção e caracterização de híbridos entre *S.galapagense* e tomateiro (*S. lycopersicum* cv. Micro-Tom).

Os experimentos tiveram início a partir do cruzamento entre a espécie selvagem *S. galapagense* LA1401 (parental não recorrente ou doador) e MT (parental recorrente) (figura 9 A). Deste cruzamento foi obtida a geração F₁, cujas plantas apresentaram de modo geral porte normal, isto é, tal qual o porte de espécies selvagens, e, no entanto um pouco menor do que *S. galapagense*. Assim, plantas desta geração F₁ foram preservadas para que ocorresse a autofecundação dando origem a plantas da geração F₂. Tais plantas foram cruzadas com MT, o que resultou no BC₁, geração a partir da qual foi feita a seleção de plantas de porte micro, ou seja, com porte igual ou menor do que MT (figura 9 A). Estas plantas selecionadas foram deixadas autofecundar por sucessivas gerações até obter uma população de aproximadamente 250 plantas

em BC₁F₃. A obtenção deste material foi de grande importância para a seleção de indivíduos portadores do até então suposto gene *gdw*, capaz de controlar altura e germinação e possivelmente de caráter monogênico. Diz-se suposto gene porque inicialmente existiam questões ainda não respondidas a respeito do curioso fenótipo descrito, como, por exemplo, a ocorrência deste fenótipo oriunda de algum componente de sinalização de GA, tais quais mutações no domínio DELLA (ALVEY; HARBERD, 2005). De modo geral, essa população obtida em BC₁F₃ era composta por plantas com diferenças morfológicas relacionadas à altura e arquitetura foliar. Entretanto, certas plantas destacaram-se das demais por apresentar características bastante semelhantes àquelas vistas em *S. galapagense*, porém em porte MT. Observou-se acentuada redução do porte, folhas contendo folíolos cujos bordos eram bastante recortados, hábito de crescimento do tipo indeterminado e fruto na fase de pré-maturação com coloração verde escuro. Esta observação sugere uma possível identidade desta planta observada com a espécie selvagem, indicando que estas características derivaram-se de *S. galapagense* (figura 9 B). Vale a ressalva de que estas características fenotípicas são divergentes em relação àquelas vistas em MT. Esta cultivar apresenta folhas cujos folíolos não apresentam pronunciado recorte e os frutos na fase de pré-maturação possuem coloração verde claro. Além disso, já se sabe que o porte reduzido de MT deve-se à mutação *dwarf* (MARTÍ et al., 2006), não sendo causada por quaisquer alterações relacionadas à GA. Hoje, sugere-se que este fenótipo esteja relacionado a baixos níveis no hormônio brassinoesteróide (MARTÍ et al., 2006).

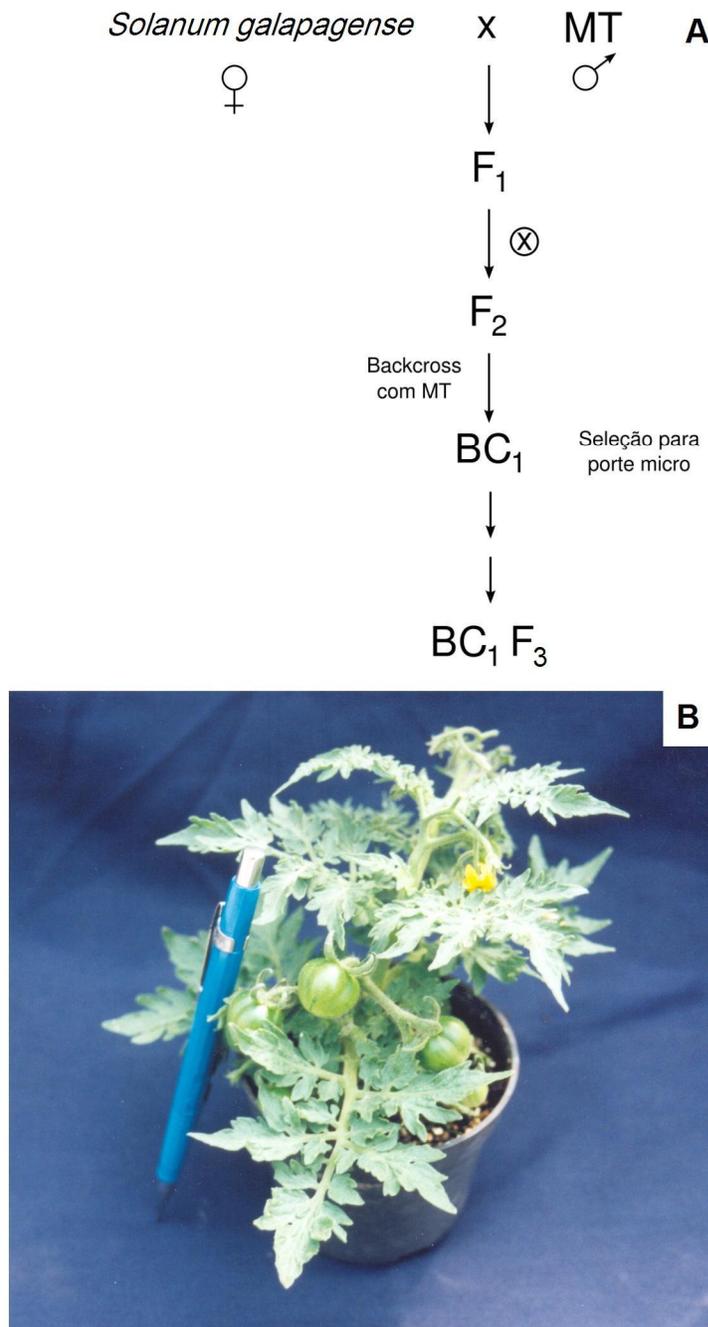


Figura 9 – Representação esquemática dos cruzamentos iniciais de *Solanum galapagense* LA1401 com a cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom (MT), até a obtenção da geração BC₁F₃, para seleção de plantas de porte micro. Abaixo, fenótipo apresentado por estas plantas em que se pode observar entrenó curto, crescimento indeterminado, recorte foliar pronunciado e frutos de coloração verde escuro

A fase seguinte teve como meta principal estudar e desvendar os fatores relacionados à expressão do fenótipo que despertou atenção em BC₁F₃. Desta maneira, este material foi semeado

e deixado autofecundar até a obtenção da geração BC₁F₄. Visando compreender o comportamento destas plantas em relação à germinação de sementes foi realizado um experimento para testar a taxa de germinação de BC₁F₃ quando tratadas com água destilada (controle) e quando tratadas com 100 µM de GA₃. Além destes dois tratamentos, foram utilizadas sementes de MT tratadas com água destilada. O experimento foi monitorado a cada 12 horas permitindo a construção de uma curva ao longo do tempo até que se atingisse o tempo de 180 horas. Encerrado o período de avaliações e pautando estes dados numa planilha foram obtidas três curvas relacionando a porcentagem das sementes germinadas no transcorrer do tempo (figura 10 A). Através deste teste foi possível esclarecer a base genética da germinação do genótipo BC₁F₃. A principal informação obtida foi de que as sementes deste genótipo possuem germinação reduzida quando em contato com água destilada e que, ainda que haja adição de GA₃, não é possível recuperar os níveis de germinação tal como aquele observado no controle MT.

Com base nestas informações um segundo teste foi realizado, desta vez para verificar a altura destas plantas quando submetidas a diferentes concentrações de GA₃ (figura 10 B). Além dos genótipos já testados anteriormente no teste de germinação foram acrescentados dois genótipos conhecidos, cuja base genética já é conhecida em estudos com mutantes hormonais ligados a GA. Trata-se dos mutantes *procera* (JONES, 1987; VAN TUINEN et al., 1999) e *gib3* (KOORNNEEF et al., 1990), de resposta constitutiva e deficiente nesta classe hormonal, respectivamente. Foram testadas as doses 0, 10, 50, 100 e 500 µM de GA₃ em 16 plantas de cada um dos quatro genótipos, cujas alturas foram monitoradas a cada dois dias, estendendo-se por um período de cerca de 36 dias. Este teste permitiu compreender que da mesma forma que acontece para a taxa de germinação, o genótipo BC₁F₃ responde sutilmente ao incremento na altura, ainda que haja adição de GA₃ em diferentes concentrações. Por sua vez, quanto ao comportamento da altura de MT, esta se manteve discretamente aumentada, o que pode ser explicado em grande parte por efeito do ambiente, o que já era de se esperar quando avaliado este tipo de característica, especialmente no ambiente de casa de vegetação. Em contrapartida, os genótipos *procera* e *gib3* mostraram o comportamento conhecido, de forma que o primeiro, por ser supersensível ao hormônio, apresentou incremento na altura com a menor dose de GA₃ testada (10 µM), e *gib3*, sendo um mutante deficiente recuperou a altura de tal forma a apresentar porte semelhante ao de MT quando tratado com 500 µM de GA₃. Ao avaliar o porte sem o tratamento com GA foi feito um teste adicional em que, além dos genótipos BC₁F₃, MT e *pro*, foi testado o

duplo mutante BC_1F_3pro . Com auxílio estatístico utilizando o teste Tukey observou-se que BC_1F_3 e MT não diferem entre si, enquanto *pro* difere de ambos, além de diferir também do duplo mutante. Este, porém, apesar de diferir estatisticamente de BC_1F_3 e de *pro*, apresentou altura final numericamente intermediária ao valor observado para BC_1F_3 e *pro* quando avaliados individualmente (figura 10 C), supostamente provocado por efeito aditivo. Esta informação, a princípio, indicou a possibilidade de BC_1F_3 não estar ligado a GA e também de que é possível não só passar características de *S. galapagense* para MT, mas também respostas fisiológicas ligadas a GA. Seguindo esta idéia é possível crer que tais características presentes em *S. galapagense* poderiam atuar tal como em situações em que há efeito pleiotrópico.

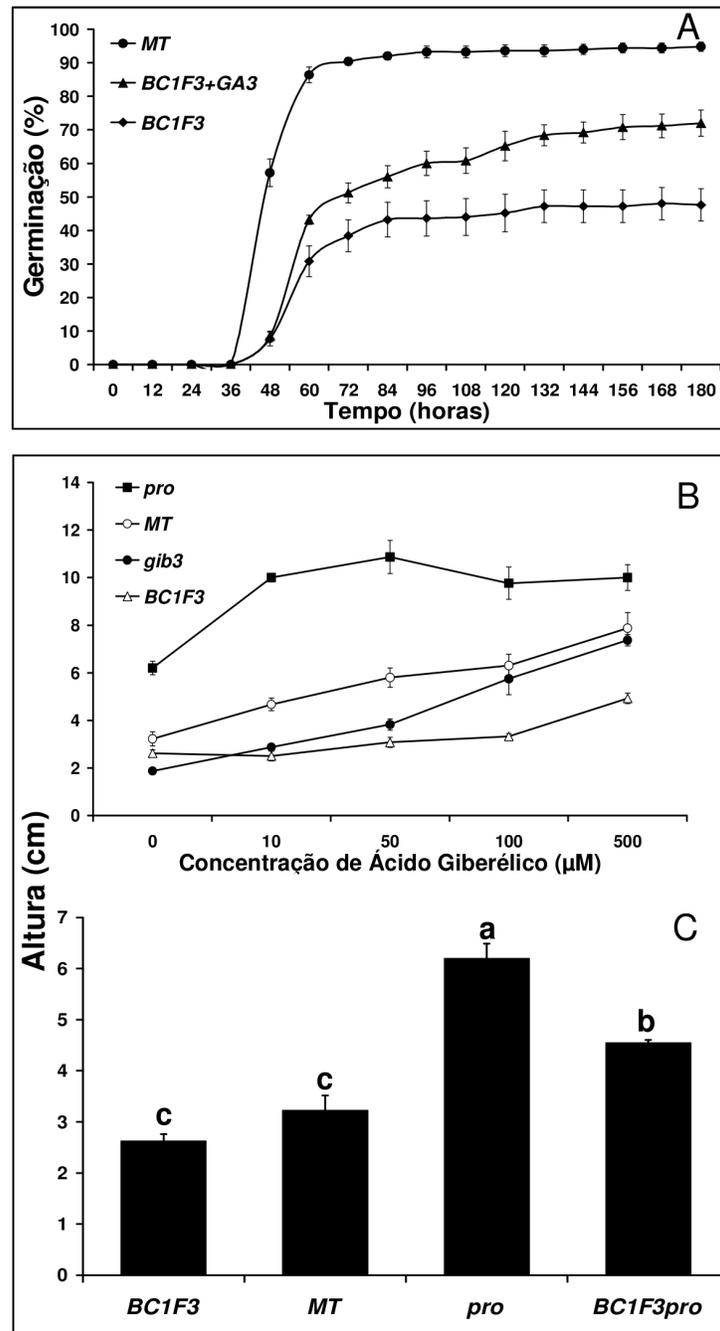


Figura 10 – Teste de sensibilidade a giberelina. A) Teste de germinação dos genótipos MT e BC₁F₃ (isolado de *Solanum galapagense*) em água destilada, e em solução contendo 100 µM de ácido giberélico (GA₃). Foram feitas três repetições por genótipo, sendo cada uma composta por 50 sementes. B) Curva de dose-resposta a GA₃ dos genótipos *pro*, MT, *gib3* e BC₁F₃ para estudo de altura. C) Alturas finais aos 41 dias de BC₁F₃, MT, *pro* e do duplo mutante BC₁F₃*pro*. Avaliações seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,05$, Tukey). Para altura foram usadas dez repetições por genótipo

Um teste semelhante foi feito, desta vez para avaliar a arquitetura foliar dos genótipos de interesse deste trabalho. O objetivo principal foi o mesmo buscado quando realizado o teste descrito da figura 10 C. Com auxílio de um scanner foi possível obter imagens das folhas com seus respectivos folíolos, o que é de extrema importância quando são estudados caracteres morfológicos (figura 11). Neste ensaio foram testados MT, *procera*, *gib3* e MT + GA₃ e também BC₁F₃, BC₁F₃ + GA₃ e os duplos mutantes *BC₁F₃pro* e *BC₁F₃gib3*. Tanto a aplicação de GA₃ nas folhas de BC₁F₃, quanto à obtenção de duplos mutantes com alterações em GA, levou a um fenótipo aditivo. Este dado sugere que o genótipo vindo do cruzamento entre de *S. galapagense* e MT não é um mutante em GA.

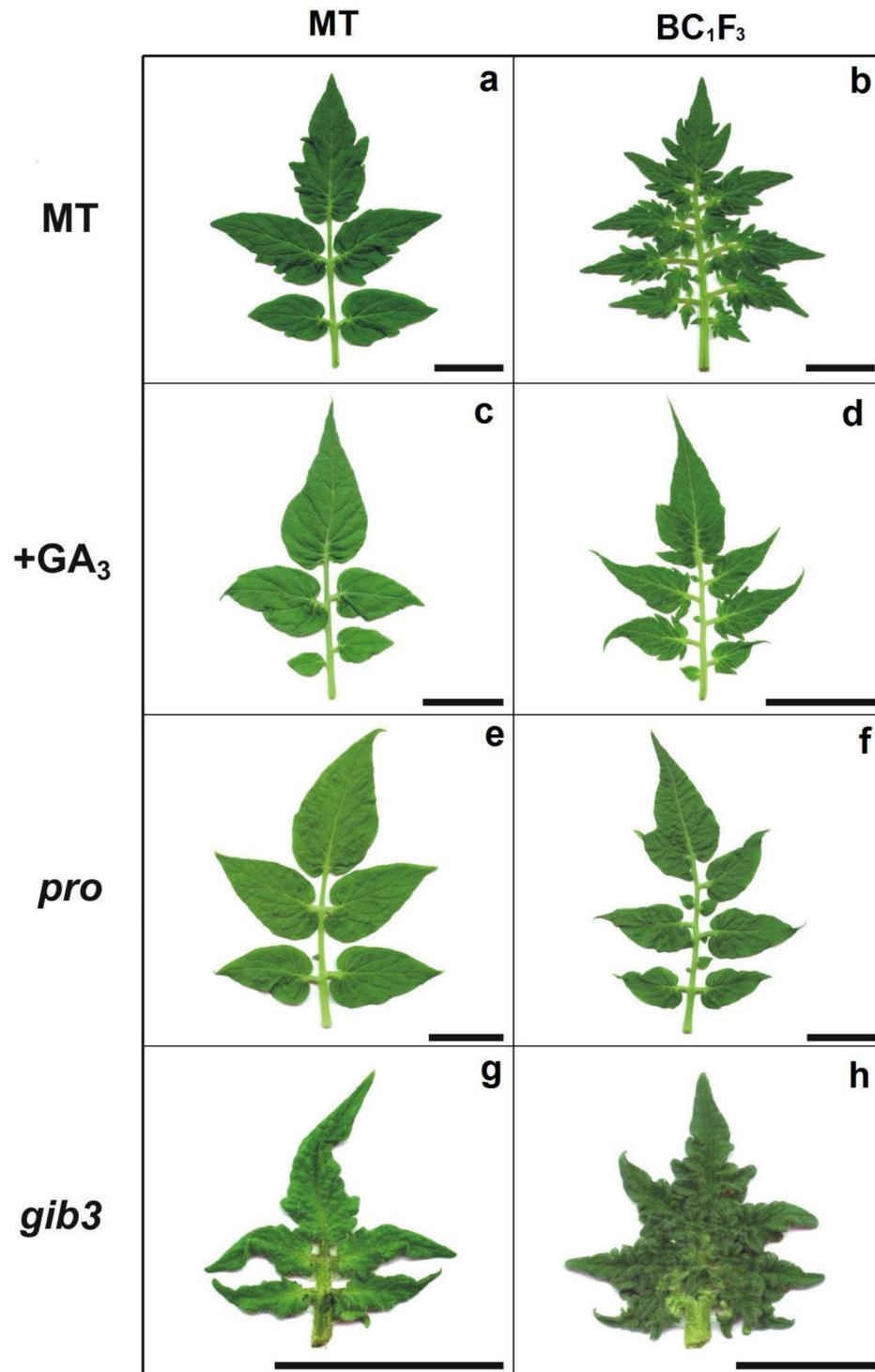


Figura 11 – Efeito da aplicação de 100 μ M de giberelina (+ GA₃) em MT e BC₁F₃, e o impacto nas alterações da arquitetura foliar em duplos mutantes de MT e BC₁F₃ com os mutantes em GA *gib3* (deficiente) e *pro* (supersensível). Barra = 2 cm

2.4.2 Introgessão do nanismo de *S. galapagense* em MT

O isolamento do gene putativo capaz de afetar características oriundas de *S. galapagense* e ao mesmo tempo comum a mutantes em tomateiro deficientes em GA foi estrategicamente planejado no sentido de entender tanto a composição genética quanto a caracterização fenotípica. Foi elaborado um esquema dos cruzamentos realizados ao longo da execução do trabalho e suas respectivas composições alélicas, o que foi bastante vantajoso no sentido de otimizar o tempo, fato este importante quando envolvem-se cruzamentos controlados e que necessitam de grande rigor na seleção dos caracteres a serem isolados. A figura 12 ilustra o esquema seguido durante a etapa de introgessão do nanismo da espécie selvagem em MT.

Ao observar este esquema vale destacar o *box* verde, relativo a BC_2F_2 . Nesta fase foi feito um teste de segregação em estrutura de casa de vegetação para testar a natureza do nanismo característico presente em algumas plantas. Desta forma, semeou-se este material BC_2F_2 para obtenção de aproximadamente de 250 plantas (média do número de plantas usadas neste tipo de teste em protocolo por nós estabelecido). As plantas foram identificadas uma a uma de forma que foram monitoradas individualmente. Foram observadas e registradas características como: altura na antese (figura 13 A), hábito de crescimento (figura 13 B) e coloração de frutos na fase de pré-maturação (figura 13 C). Para avaliar o comportamento destas plantas em relação à altura foi feito um histograma na qual realizou-se a contagem do número de plantas pertencentes a classes de altura. Computou-se a quantidade de plantas com altura na antese entre 3 e 3,9 cm, 4 a 5,9 cm, 6 a 7,9 cm, 8 a 9,9 cm, 10 a 11,9 cm, 12 a 13,9 cm e maiores do que 14 cm (figura 13 A). A distribuição observada neste caso mostrou configuração próxima de uma normal, e não bimodal (esperada quando são avaliados caracteres monogênicos). Este dado era de certa forma esperado, já que a característica altura além de passível de sofrer influência ambiental é conhecida por apresentar um padrão de distribuição normal na maioria das populações analisadas. Um tracejado vermelho desenhado destacou a altura média de MT na antese (aproximadamente 8 cm), no mesmo período em que foi realizado o experimento. Em relação ao hábito de crescimento, na antese de tais plantas, foi feita a contagem do número de plantas que apresentaram crescimento indeterminado (*Sp*) e determinado (*sp*). Neste caso, para a avaliação da segregação foi feito o teste Chi-quadrado, o qual mostrou que para este caractere há segregação mendeliana do tipo 3:1 (figura 13 B), em concordância com o caráter monogênico de hábito de crescimento. Mais tarde, quando as plantas começaram a produzir frutos, o mesmo teste foi feito, desta vez mostrando que para a característica coloração de fruto na fase de pré-maturação (verde claro ou verde escuro) não ocorre segregação mendeliana 3:1 (figura 13 C). Este dado despertou a atenção sugerindo que esta característica poderia ser monogênica caso o BC_1F_4 usado nos cruzamentos iniciais fosse heterozigoto (e não homozigoto), ou se houvesse a ação de mais de um gene controlando este caractere. Além disso, uma terceira hipótese suspeita é a de que o gene U- (causador do chamado ombro verde) seria um alelo de efeito forte atuando. É válido lembrar que no estágio de maturação dos frutos ocorreu segregação para o alelo *B* presente em *S. galapagense* (KIMURA et al., 2008), de forma que esta população de plantas apresentava plantas cujos frutos eram vermelhos (*bb*) ou laranja (*B-*) (dados não mostrados).

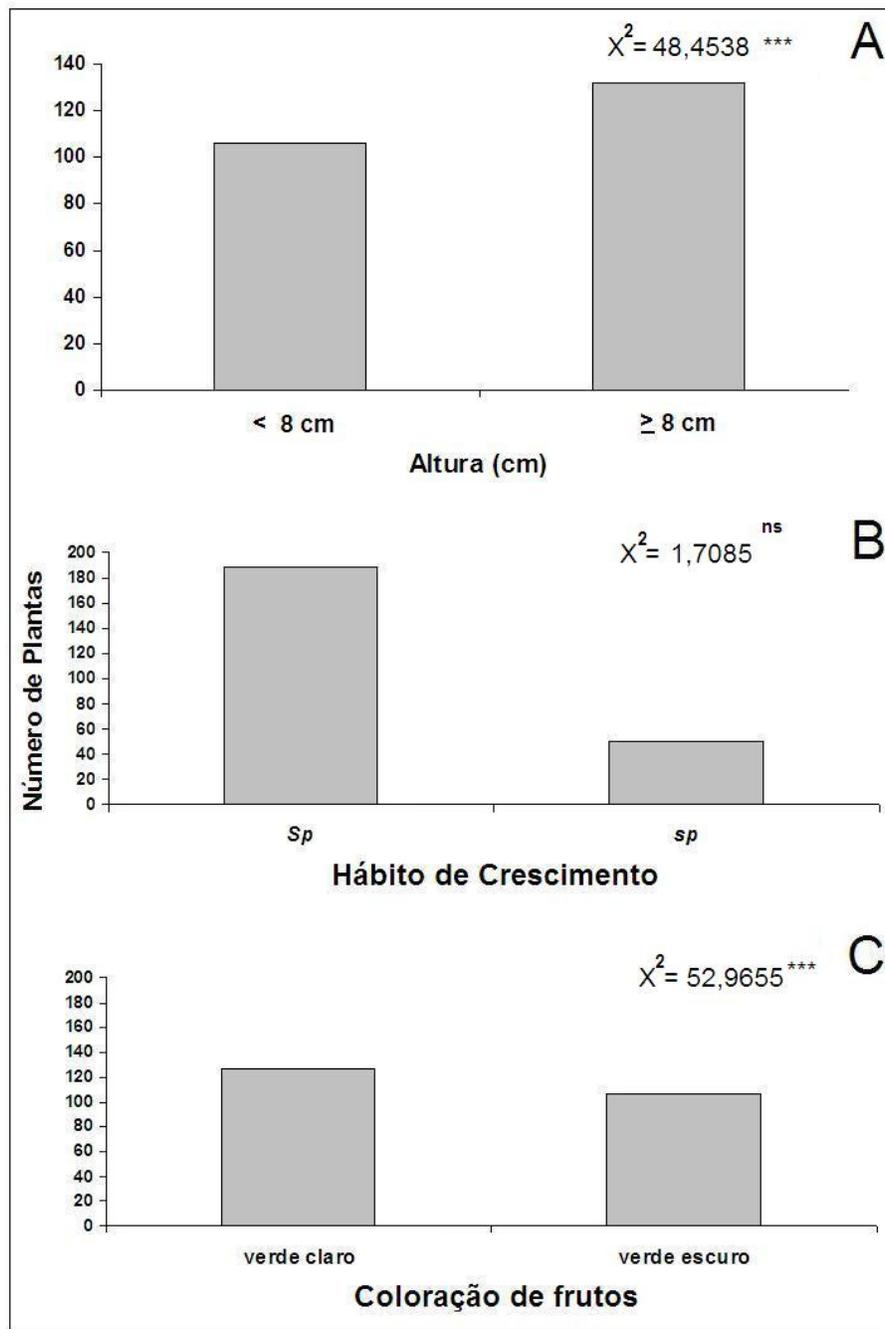


Figura 13 – Descrição fenotípica do teste de segregação na geração BC_2F_2 avaliadas na antese. A) Total de plantas menores que 8 cm (tamanho médio de MT) e maiores ou iguais a 8 cm, sendo 238 o total de plantas avaliadas. B) Número de plantas com porte determinado (*sp*) e indeterminado (*Sp*), sendo avaliadas 239 plantas. C) Quantidade de plantas que formaram fruto verde claro e verde escuro, sendo avaliadas 232 plantas. Valores de χ^2 não significativos indicam segregação 3:1

Na mesma geração em que foi estudada a segregação descrita acima foi feita uma seleção rigorosa para porte. Um total de oito plantas foram selecionadas como possíveis portadoras do alelo que levasse às características observadas, especialmente ao nanismo, parâmetro principal de seleção das plantas. Estas então foram denominadas elites e identificadas pela numeração ordenada presente na etiqueta no período do teste de segregação no qual foram avaliadas individualmente. As plantas elites candidatas eram as de número 7, 13, 24, 63, 99, 157, 194 e 198. As sementes BC₂F₃ foram semeadas e, da mesma maneira como na geração anterior tiveram as medidas de suas alturas tomadas no momento da antese. Além das elites foram testados os genótipos MT, BC₁F₅, *Pts Sp* BC₆F_n e *Pts sp* BC₆F_n. Ao término das medições foi feito um histograma no qual se constatou que as diferenças de alturas observadas na figura 13 A não se devem unicamente a fatores ambientais. De modo geral, dentre as plantas elites, foram encontradas plantas com altura próxima daquela de BC₁F₅, e até mesmo mais baixas do que estas. Este dado foi confirmado quando realizada análise de variância (ANOVA) ou teste F. Os genótipos mencionados *Pts Sp* BC₆F_n e *Pts sp* BC₆F_n, foram importantes para fornecer a informação de que, ainda que *Pts* seja introgridido, este nanismo não é totalmente explicado por *Pts* (figura 14 A). Visando a caracterização mais detalhada dos genótipos testados foi elaborado um estudo que mostrasse graficamente (e não somente visualmente) a arquitetura foliar das plantas. Para isso foi utilizado o programa Quant, capaz de fornecer, através de imagens obtidas com auxílio de um scanner, dados como área e perímetro foliar de cada folíolo constituinte da folha. É importante destacar que somente a partir deste estágio do trabalho foi introduzido tal programa na análise dos dados. Foram necessários testes preliminares para definição do protocolo, o que não estava fixado, por exemplo, na etapa inicial em que foi feita a prancha da figura 11. O índice de recorte foliar consistiu na razão entre a área e o perímetro médios dos folíolos de cada folha. Foi destacada a quarta folha a contar a partir da inserção do par de cotilédones, sendo feitas cinco repetições, no momento da antese de cada planta. Foi surpreendente observar que algumas plantas elites, de maneira geral, apresentaram recorte foliar mais acentuado do que o controle MT, o que significaria que o *locus gdw* estaria afetando a arquitetura foliar. Conforme era de se esperar, BC₁F₅ e *Pts* apresentaram acentuado recorte foliar, característica presente de maneira expressiva nestas plantas (figura 14 B).

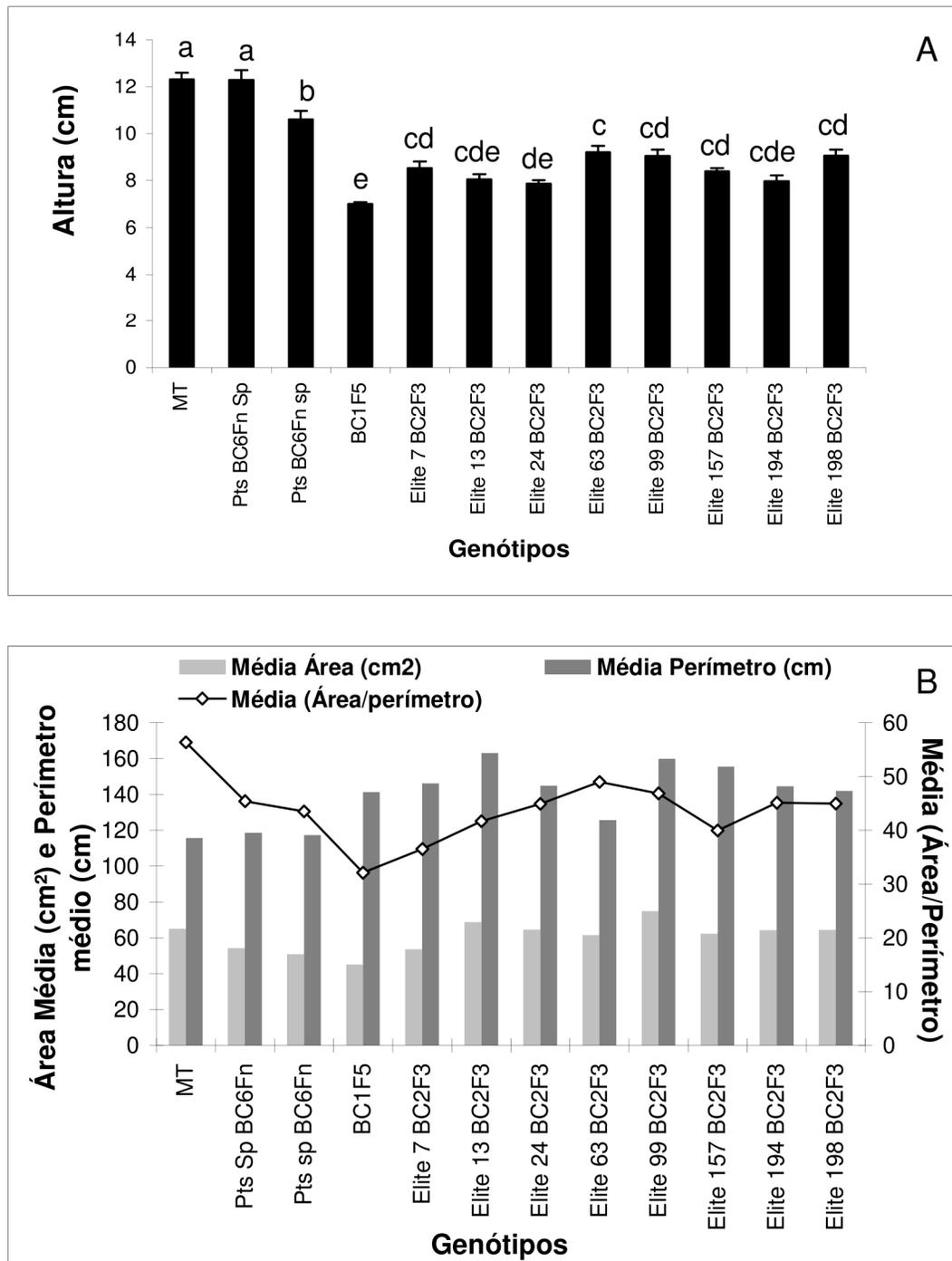


Figura 14 – Altura e índice de recorte foliar em plantas elite na geração BC₂F₃, além dos genótipos MT, *Pts Sp* BC₆F_n, *Pts sp* BC₆F_n e BC₁F₅ na antese. A) Altura média na antese dos referidos genótipos. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($P > 0,05$, t de Student). B) Área e perímetro foliar médio destas plantas. A razão área/perímetro é inversamente proporcional ao nível de recorte foliar

Os testes realizados para estudo de altura foram repetidos em seguida, tanto na geração oriunda do retrocruzamento (BC_3) quanto na geração vinda de autofecundação (BC_2F_4). O intuito principal ao executar estas medições era saber se o nanismo era recessivo ou dominante. Ao observar as plantas da geração BC_3 em casa de vegetação era claramente notável visualizar que estas plantas possuíam porte semelhante ao de MT. Paralelamente, quando o mesmo era feito entre as plantas elites BC_2F_4 e MT notava-se o porte reduzido em relação a MT. Feitas as análises fenotípicas das plantas das duas gerações sempre as comparando com MT foi esboçado o gráfico da altura média de cada planta no momento da antese (figura 15). A ANOVA ou teste F confirmou o que foi visto na casa de vegetação, ou seja, plantas BC_3 com porte igual a MT (figura 15 A) e BC_2F_4 menores que MT (figura 15 B). Curiosamente, na geração BC_3 as elites 157 e 13 também apresentaram porte baixo, estatisticamente diferentes de MT. Em BC_2F_4 quatro elites testadas mostraram altura estatisticamente igual à de BC_1F_5 (figura 15 A). Vale ressaltar que o motivo pelo qual foram testados apenas quatro genótipos elites na geração de autofecundação foi a seleção de plantas mais parecidas com MT. No caso, o critério adotado foi a coloração do fruto na fase de pré-maturação. Portanto, as elites 13, 24, 63 e 99 possuíam fruto verde escuro, mostrando ainda segregarem para esta característica. Já as outras quatro elites (7, 157, 194 e 198) eram portadoras de frutos verde-claro, de forma a possuírem esta característica já fixada e, portanto, não mais segregante. A média de altura das plantas elites vindas da geração de autofecundação foi menor que aquelas medidas tomadas nas mesmas plantas elites da geração BC_3 , sendo somente duas dessas BC_3 menores do que MT (no caso as elites 13 e 157). A análise conjunta destes resultados, tanto quando feita análise de plantas elites com MT, e também quando observadas plantas elites das duas diferentes gerações permitiu entender que o principal componente deste nanismo é recessivo (figura 15). Com base nestas informações e visando a cada geração selecionar plantas candidatas possivelmente portadoras dos alelos de interesse foi decidido trabalhar com as introgressões tendo como referencial a elite 157, pelo fato de ela ser a mais parecida com MT. Finalmente, um dado importante obtido das observações fenotípicas aliadas ao teste estatístico foi que a altura média de plantas *Pts* tanto as portadoras do alelo *Sp* quanto as portadoras do alelo *sp* foram iguais (figura 15 B), outro dado que nos leva a crer que *Pts* e *Sp* não estariam afetando diretamente na composição de altura na antese das plantas. O fato de MT *Sp* ser mais alto que MT (*sp*) indica que provavelmente houve efeito indireto da extensão do crescimento devido a *Sp*.

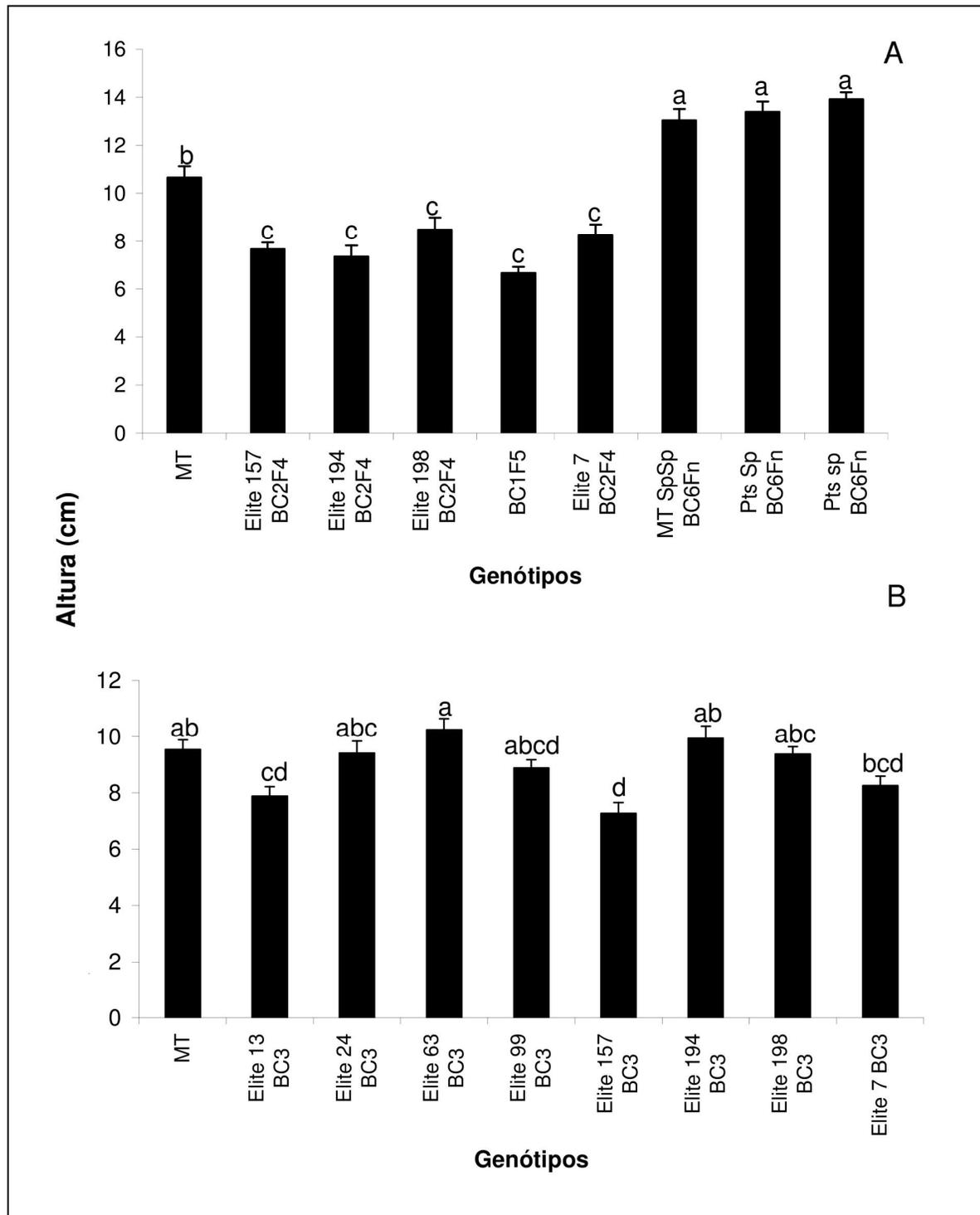


Figura 15 – Caracterização do porte de plantas elites nas gerações BC₂F₄ e BC₃ no momento da antese. A) Altura média de plantas elites BC₂F₄, MT, MT Sp BC₆F_n e BC₁F₅. B) Altura média de plantas elites BC₃ e MT. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,05$, t de Student)

De maneira complementar aos resultados obtidos até o momento partiu-se para o experimento de germinação. Numa primeira fase foram testados, além da elite 157 BC₂F₃, MT, BC₁F₅, *Pts Sp* BC₆F_n e *Pts sp* BC₆F_n (figura 16 A). As avaliações eram feitas a cada 12 horas, até que se alcançasse estabilidade dos índices de germinação. Finalizado o teste foi surpreendente notar a baixa germinação de *Pts sp* BC₆F_n e da elite 157 BC₂F₃, ao contrário dos demais genótipos testados que germinaram normalmente. Este resultado da planta elite nos levou a acreditar que o nanismo estaria ligado a uma redução na germinação. Estes resultados não se mostraram convincentes na medida em que apontou um baixo índice de germinação para *Pts sp* BC₆F_n, dado este não esperado até então. Desta forma, visando confirmar este resultado e repetir o teste de germinação em uma geração mais avançada de autofecundação foi feito um segundo experimento (figura 16 B). Desta vez foi interessante testar duas elites, sendo que a elite 157 BC₂F₄ foi mantida para efeito de comparação com os dados obtidos no teste anterior. A segunda elite testada, neste caso, foi a 194, pelo fato de, dentre as outras elites, ter mostrado numericamente a menor altura na antese quando feitas as medidas em BC₂F₄. Além deste genótipo, incluiu-se no experimento o MT *Sp* BC₆F_n, cuja finalidade foi testar a ação do alelo *Sp* quando isolado no background da cultivar MT. Neste teste ficou claro que a dormência observada em *Pts sp* BC₆F_n permanecia, porém a baixa germinação observada na elite 157 em BC₂F₃, apesar de numericamente menor comparada aos genótipos que germinam normalmente, não foi mais observada. Logo, hipotetizou-se que *Pts sp* BC₆F_n poderia estar carregando um gene diferente de *Pts* capaz de afetar a germinação. Pode ser inclusive que o recorte foliar observado nesse genótipo não seja efeito de *Pts*, e sim deste novo gene hipotético.

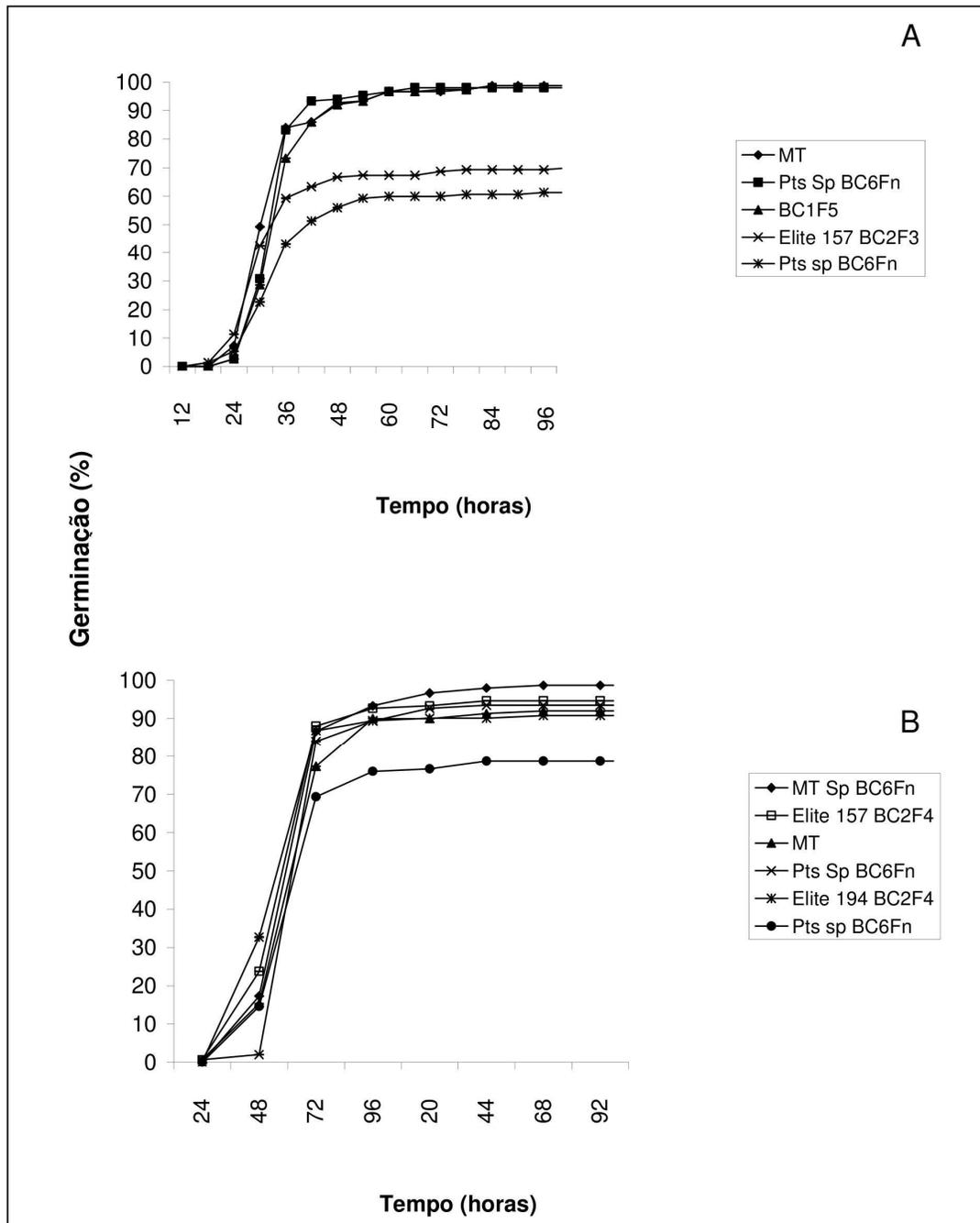


Figura 16 – Avaliação da germinação de sementes. A) Germinação monitorada a cada 12 horas testando MT, *Pts Sp BC₆F_n*, BC₁F₅, Elite 157 BC₂F₃ e *Pts sp BC₆F_n*. B) Germinação de MT, MT *Sp BC₆F_n*, *Pts sp BC₆F_n*, *Pts Sp BC₆F_n* e duas elites na geração BC₂F₄ (neste caso, 157 e 194). As avaliações foram feitas a cada 24 horas. Para ambos os gráficos foram feitas 3 repetições, cada uma contendo 50 sementes

2.4.3 Caracterização do nanismo

Após uma série de testes para verificar altura, germinação e arquitetura foliar, foi necessário determinar a melhor estratégia que pudesse facilitar e garantir o isolamento do suposto gene responsável por provocar respostas simultaneamente típicas em mutantes de tomateiro deficientes em GA e comum a características fenotípicas observadas em plantas de *S. galapagense*. Seguindo o esquema ilustrado na figura 4 pode-se visualizar a formação de uma população de plantas da geração BC₃F₂, vinda da autofecundação de plantas BC₃, aquela composta de plantas possivelmente heterozigotas. Curiosamente, as plantas vindas da geração de autofecundação apresentaram encurtamento de entrenós bastante acentuado, fato interessante para a tomada de decisões a respeito da condução dos testes a partir de então. É válido lembrar que o aparecimento destas plantas não descartou as outras estratégias de retrocruzamentos das demais gerações da elite 157 com MT. Desta forma, o objetivo principal deste tópico foi o de, uma vez obtidas plantas BC₃F₃ oriundas de *S. galapagense*, caracterizar o nanismo, bem como entender como ele estaria afetando as características germinação e recorte foliar. Para isso, foi feito um experimento em que pudesse facilitar o entendimento da contribuição de cada gene em cada uma das três características acima descritas. Logo, alguns genótipos foram previamente escolhidos para serem semeados e em seguida terem altura, germinação e arquitetura foliar monitorados. O teste foi importante não só por fornecer maiores informações sobre a própria elite 157 BC₃F₃ (uma vez que esta era a população com maior chance de possuir *gdw*), mas por permitir comparações entre genótipos que são contrastantes pelo fato de diferirem em um alelo. Neste caso, os genótipos contrastantes pré-determinados eram MT *Sp* BC₆F_n *versus* MT, MT *Sp* BC₆F_n *versus* *Pts Sp* BC₆F_n e Elite 157 BC₃F₃ *versus* MT. Esta estratégia facilitaria ver a contribuição de *Sp*, *Pts* e do suposto *gdw*, respectivamente. Para testar a arquitetura foliar, seguiu-se a metodologia descrita anteriormente, de forma a obter três gráficos referentes aos genótipos contrastantes (figuras 17 A, B, C).

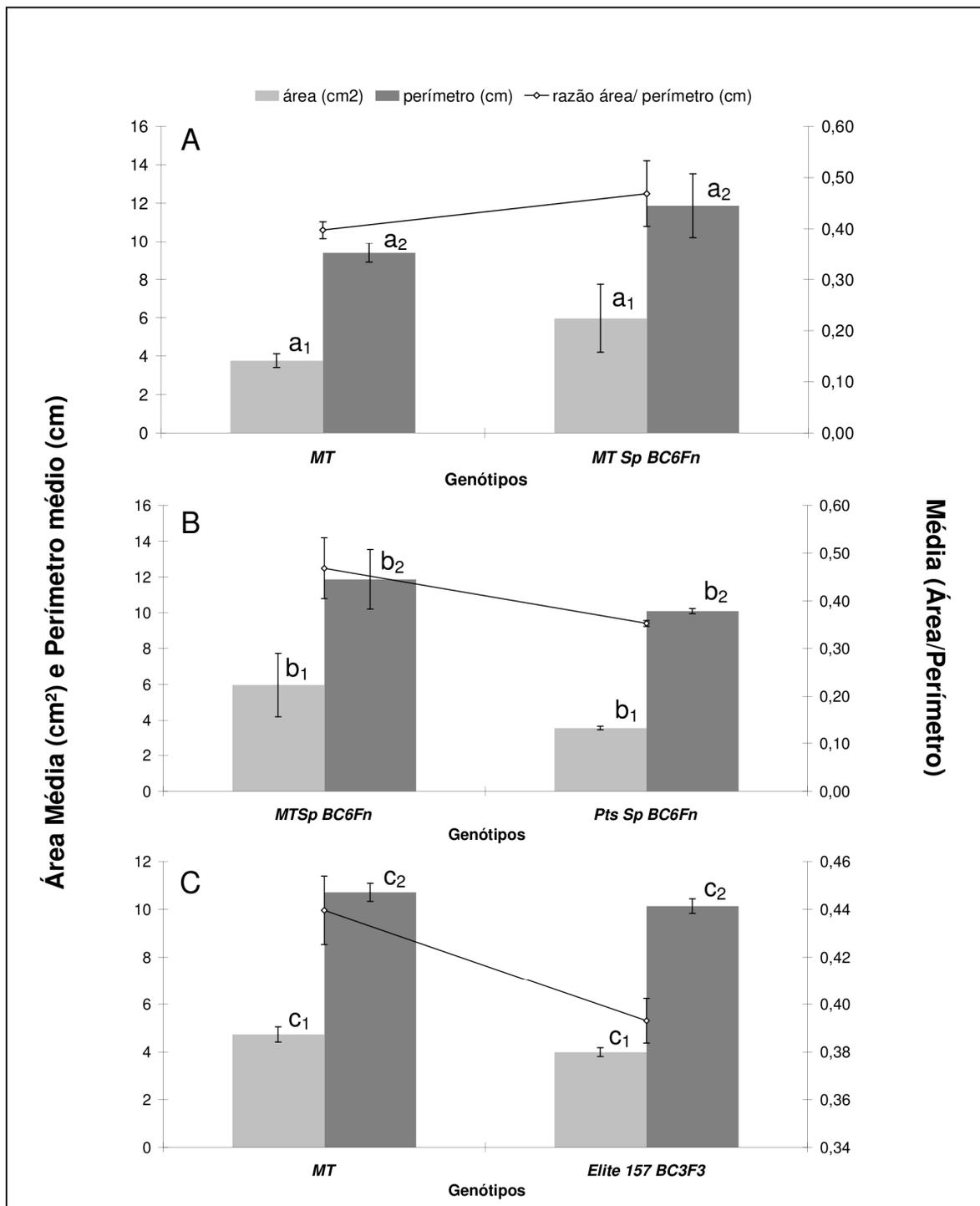


Figura 17 – Estudo de recorte foliar em genótipos contrastantes (representado pela razão entre área e perímetro), e os valores individuais de área e perímetro. A) MT versus MT Sp BC₆F_n. B) MT Sp BC₆F_n versus Pts Sp BC₆F_n. C) MT versus Elite 157 BC₃F₃. Médias seguidas por letras iguais com índices iguais não diferem entre si ($P > 0,01$, t de Student). O teste foi realizado utilizando-se 5 folhas por genótipo

Na determinação do índice de recorte foliar foi levada em consideração especialmente a razão entre a área e o perímetro foliar. De acordo com o gráfico 17 A, referente à ação do alelo *Sp*, observa-se que a razão entre a área e o perímetro foliar é maior quando comparado a MT, homozigoto recessivo para este alelo. Este resultado indica que o alelo *Sp* interfere no recorte foliar, embora estatisticamente, pelo teste t, estes resultados mostrem que esta diferença não é significativa. Já quando avaliada a ação do alelo *Pts* (figura 17 B), é possível visualizar no gráfico que este alelo tende a provocar diminuição da razão entre a área e o perímetro foliar, o que já era de esperar, visto que este alelo produz folhas com bordos que apresentam acentuado recorte, o que já é conhecido na literatura (RICK., 1980). Entretanto, a análise estatística usando o teste t mostra que esta diferença não é significativa. Finalmente, a mesma análise feita para testar o efeito do alelo *gdw* sobre o recorte foliar mostra que este afeta a arquitetura, ainda que novamente o teste t não mostre diferença significativa. É importante destacar que, por se tratar de caracteres morfológicos é levada em consideração a análise conjunta dos resultados obtidos graficamente, além das imagens obtidas seja, por foto, um com auxílio de um scanner. Assim, na antese dessas plantas foram feitas imagens de folhas representativas (figura 18), a exemplo do que foi feito no início dos experimentos e já mostrado na figura 3. Seguindo este esquema foi feito o mesmo para a análise de altura na antese. É evidente notar que no caso do contraste em que é testada a ação de *gdw* há uma diferença facilmente perceptível nas alturas, o que não foi tão evidente quando testado o segundo contraste. Na figura 18A é possível perceber que estatisticamente houve diferença de altura entre *Pts Sp BC₆F_n* e MT *Sp BC₆F_n*, segundo teste t, o que mostra que o alelo *Pts* contribuía, embora de maneira não tão pronunciada no incremento da altura, dado este consistente visto que ele é um *KNOX*, isto é, genes expressos em padrões específicos nos meristemas e que possuem importante função na manutenção meristemática. (JACKSON et al., 1994, LONG et al., 1996; NISHIMURA et al., 1999; SENTOKU et al., 1999; ORI et al., 2000). É importante lembrar que o experimento foi feito com um número considerável de plantas (cerca de 40). No gráfico 18 B é confirmada a diferença entre as alturas de MT e da Elite 157 BC₃F₃. Para efeito de comparação adicionou-se o valor numérico da altura média na antese das mesmas plantas, porém já na geração BC₄, oriunda do retrocruzamento de BC₃. Por sua vez, foi interessante perceber que estas plantas apresentavam porte de MT, o que mais uma vez reforça a idéia de que o nanismo seria mesmo recessivo. No terceiro genótipo de contraste,

representado graficamente em 18 C, é possível concluir que o alelo *Sp* não altera a altura de maneira significativa.

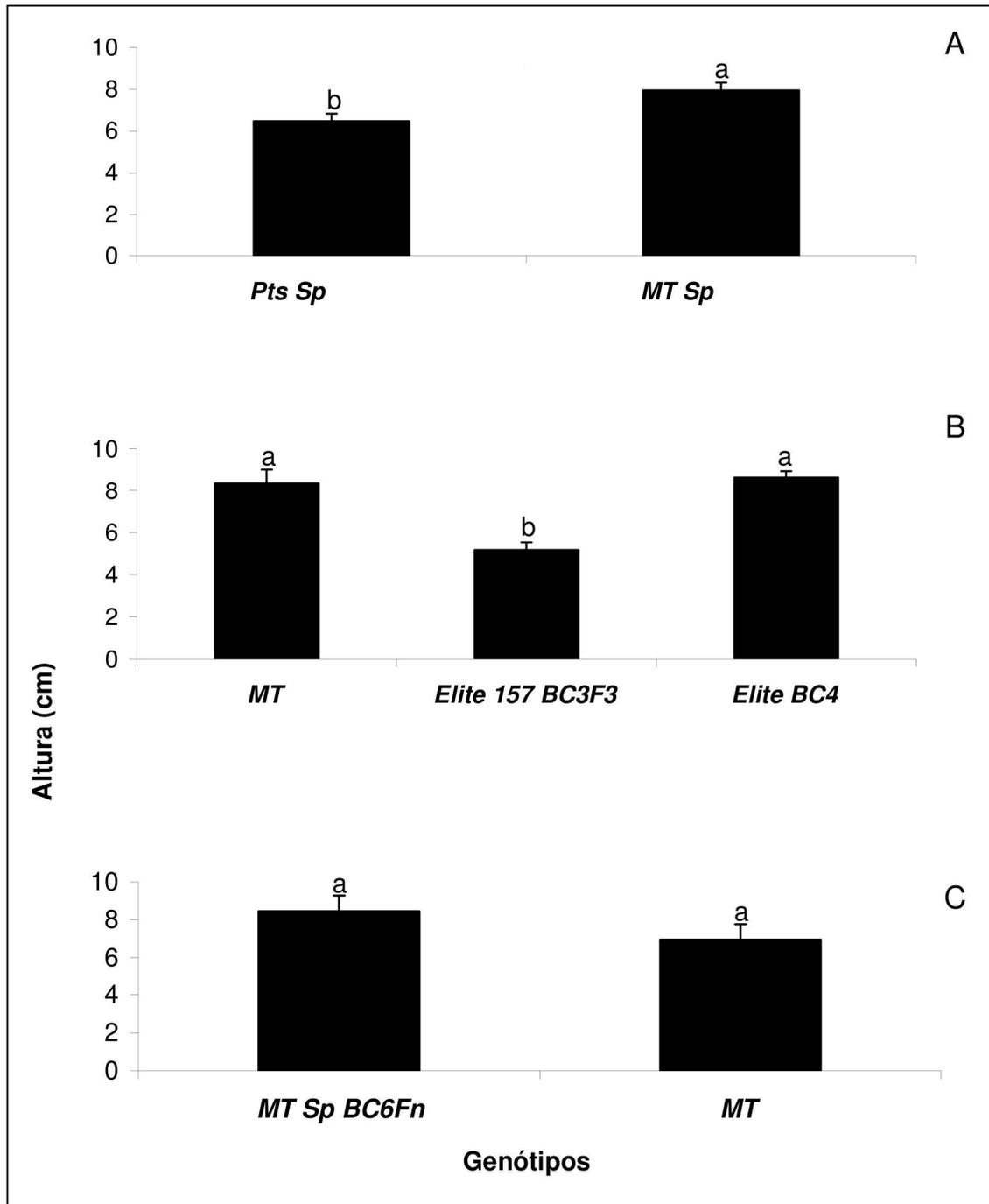


Figura 18 – Altura média na antese. A) *Pts Sp* BC₆F_n versus *MT Sp* BC₆F_n. B) *MT* versus *Elite 157 BC₃F₃* (*gdw gdw*) e *Elite BC₄* (*Gdw gdw*). C) *MT Sp* BC₆F_n versus *MT*. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si ($P > 0,01$, t de Student). No teste foram feitas 30 repetições por genótipo

Finalizados estes testes, foi montado o experimento de caracterização final dos genótipos contrastantes para avaliação de germinação. O protocolo adotado foi aquele descrito anteriormente. As avaliações foram feitas a cada 24 horas. Ao comparar MT com MT *Sp* BC₆F_n foi observada uma sutil diferença em relação à rapidez da germinação do genótipo portador do alelo *Sp*, fato constatado somente nos primeiros intervalos de tempo do teste (figura 19 A). Este resultado foi interessante visto que este gene SP, conhecido como um fator de transcrição (PNUELLI et al., 1998), não tinha sido então ligado à germinação, mas somente componente do florescimento (PNUELLI et al., 1998). Logo em seguida, é possível visualizar o contraste entre MT *Sp* BC₆F_n e *Pts Sp* BC₆F_n em que, como no caso anterior, apresentou um atraso na germinação, o que possivelmente seria explicado por ação endógena (como baixos níveis de GA) em *Pts Sp* BC₆F_n, já que trata-se de um *KNOX* (figura 19 B). Finalmente, no teste do efeito de *gdw*, o resultado obtido foi de que o novo *locus* produz plantas com germinação não alterada, ou seja, idêntica à de MT (figura 19 C).

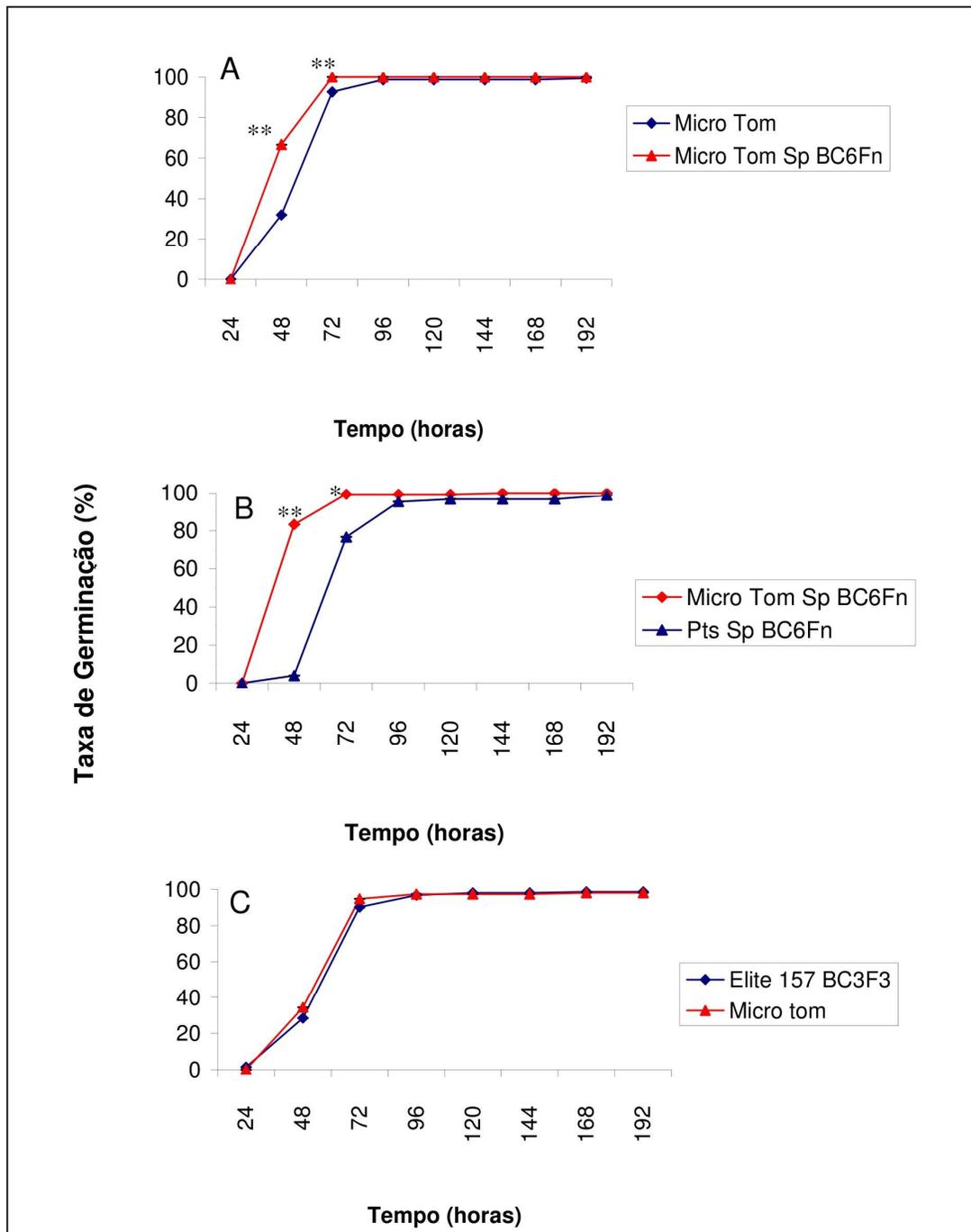


Figura 19 – Germinação de sementes de genótipos contrastantes, avaliados a cada 24 horas. Foram feitas 3 repetições para cada genótipo sendo cada repetição composta por 50 sementes. A) MT *versus* MT Sp BC₆F_n. B) MT Sp BC₆F_n *versus* Pts Sp BC₆F_n. C) Elite 157 BC₃F₃ (*gdw*) *versus* MT mostrando taxas de germinação não alteradas na presença de *gdw*. Os asteriscos indicam que as médias diferem entre si pelo teste *t* com (**: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$)

Os experimentos finais destinaram-se a avaliar o padrão de segregação de plantas BC_4F_2 , provenientes de retrocruzamento das elites 157 BC_3F_2 com MT. Para isso, foi destinada uma bancada em casa de vegetação, capaz de comportar uma quantidade suficiente de plantas para minimizar possíveis interferências ambientais, ou erros experimentais corriqueiros. Foram semeadas cerca de 300 sementes e após 15 dias os transplantes foram feitos, considerando um total de quase 280 plantas. As características fenotípicas avaliadas foram altura na antese e o padrão da arquitetura da folha, designados R para folhas com bordos recortados e NR para folhas com bordos lisos.

No experimento em que se avaliou a altura na antese computou-se um total de 82 plantas cuja altura era menor que 8 cm (altura média de MT de mesma idade) e 196 com altura maior ou igual a 8 cm. Já na avaliação do recorte foram observadas 86 plantas com bordos foliares recortados e as 191 restantes que possuíam folhas com bordos lisos. Com esses pares de dados foi possível calcular o valor do Chi-quadrado, de maneira que ambas as características avaliadas, altura e recorte foliar, apresentaram o padrão de segregação mendeliana do tipo 3:1 (figura 20).

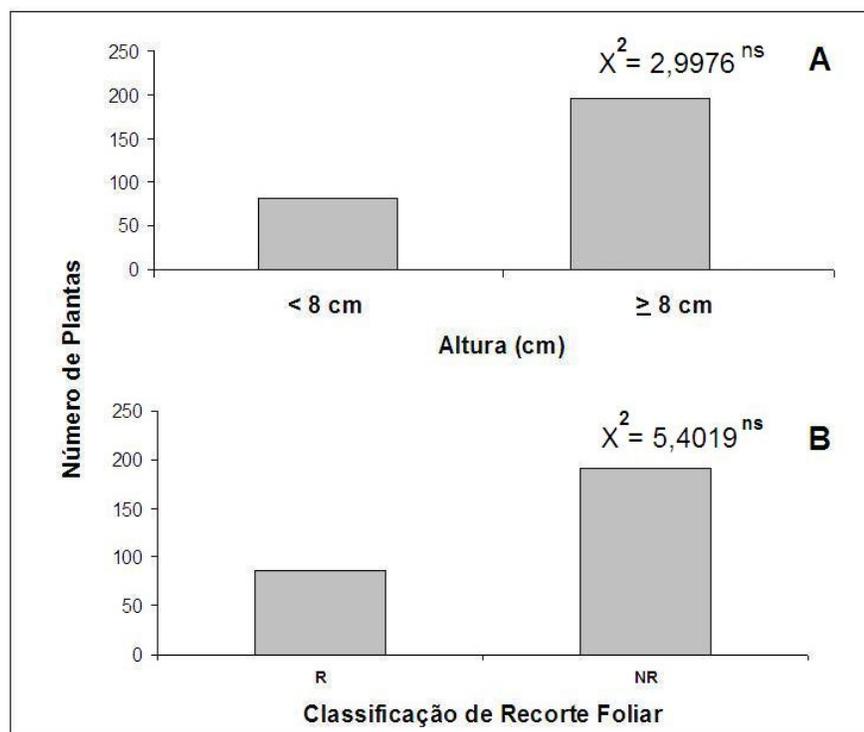


Figura 20 – Segregação de altura e recorte foliar em 277 plantas BC_4F_2 . A) Distribuição de plantas com alturas menores e plantas com altura maiores ou iguais a 8 cm. B) Distribuição de plantas com folhas recortadas (R) e não recortadas (NR). Valores χ^2 não significativos indicam segregação 3:1

Finalmente, como complemento da caracterização final quanto à arquitetura foliar, utilizou-se um *scanner* para obter imagens de folhas representativas de *gdw* da geração BC₃F₃, introgridido em MT, além de imagens de folhas de MT, MT *Sp* BC₆F_n e *Pts Sp* BC₆F_n, para fins de comparação.

A análise da imagem permite esclarecer que amostras foliares de plantas contendo o *locus gdw* possuem recorte pronunciado, semelhante ao observado em plantas portadoras do *locus Pts*. Este dado constatado é interessante no sentido de permitir que seja levantada a hipótese de que existe a possibilidade de que o recorte foliar de *S.galapagense* seja devido à ação dos dois *locus gdw* e *Pts*.



Figura 21 –. Fenótipo das folhas representativas para recorte foliar. Da esquerda para a direita: *gdwgdw* BC₃F₃, MT, MT *Sp* BC₆F_n e *Pts Sp* BC₆F_n

2.5 Discussão

No presente trabalho, foram estudadas as bases genéticas de três características fisiológicas: nanismo, dormência e arquitetura foliar. O nanismo e a arquitetura foliar, como já descrito ao longo do trabalho, podem ser facilmente empregados como marcadores morfológicos em estudos de genética e fisiologia de plantas. Além disso, sabe-se que esses dois caracteres são, em geral, controlados por GA (DAVIES, 1995; GRAY, 1957; ROSIN et al., 2003). A ligação

entre GA e arquitetura foliar reside na ação dos genes *KNOX*, os quais estão intimamente relacionados com a formação de folhas compostas (HAREVEN et al.; 1996). Esses fatores de transcrição agem no meristema apical caulinar impedindo que todo o tecido meristemático se diferencie em órgãos laterais (folhas). Desse modo, uma menor expressão dos genes *KNOX* pode levar à ocorrência de folhas mais simples (com menos folíolos ou menos recortes nestes), já que o meristema caulinar se diferenciará precocemente, reduzindo a elaboração necessária para formação de uma folha mais recortada ou composta (SINHA et al., 1993). Por sua vez, sabe-se que grande parte do efeito dos genes *KNOX* se deve à regulação negativa da enzima GA₂₀ oxidase (TANAKA-UEGUCHI et al., 1998; SAKAMOTO et al., 2001; HAY et al., 2004), a principal enzima envolvida na biossíntese de GA (HEDDEN; PHILLIPS; 2000).

Recentemente, o gene *PTS*, o principal responsável pelo recorte característico de *S. galapagense* (RICK, 1980), foi clonado. Este trabalho trouxe uma informação enriquecedora, no sentido de, pela primeira vez revelar que este gene é um *KNOX*, sem o homeobox (KIMURA et al., 2008). Este resultado, especialmente aplicado ao enfoque do presente trabalho nos fez crer que, de certa forma, *Pts* poderia influenciar outras características afetadas por GA, como altura e germinação, as quais também são características de *S. galapagense*.

Assim, é possível afirmar que, neste trabalho pela primeira vez foi demonstrado de fato que o alelo *Pts* é capaz de levar à redução de altura e germinação (figuras 18 A e 19 B, respectivamente). Apesar deste dado inédito, é improvável afirmar que o pequeno efeito de *Pts* (embora significativo em algumas frações de tempo apuradas ao longo do teste) seja suficiente para explicar sozinhas a germinação, e também a altura na antese. Desta maneira, foi demonstrado que existe ao menos um outro gene controlando a altura, por nós chamado *GDW* (Galápagos Dwarf). O efeito do alelo *gdw*, presente em *S. galapagense*, é bastante acentuado, e pode ser que ele, juntamente com *Pts*, sejam os principais responsáveis pelo nanismo característico dessa espécie selvagem. Inicialmente, quando a nomenclatura utilizada era *Lycopersicon*, a denominação do atual *S. galapagense* como *L. cheesmanii. forma. minor*, mostra claramente a grande importância dessa característica para a classificação dessa espécie (SPOONER et al., 2005).

No que diz respeito à baixa germinação de *S. galapagense*, o alelo *Pts* não é capaz de explicá-la totalmente, e nem tão pouco *gdw*, o qual de fato não afeta a germinação. Contudo, é possível inferir que existam outros genes presentes em *S. galapagense* afetando germinação, os

quais ainda não foram triados para introgressões futuras. Entretanto, existe uma explicação para esta questão. Na realidade é fundamental destacar que ao longo do processo de introgressão do caractere nanismo, eram sempre selecionadas aquelas plantas que germinavam mais. Isto significa que um dos critérios utilizados para a seleção daquelas plântulas semeadas em bandejas e candidatas a transplante para vasos individuais, não era somente o vigor da plântula e/ou a idade fisiológica, mas também a própria seleção direta negativa feita por nós mesmos no ato do transplante. Desta forma, há a perspectiva da existência de algum outro gene, além de *PTS* que possa afetar a germinação. Experimentos futuros estão sendo planejados por nosso grupo do LCHDV no sentido de introgridir este fator chave que leve à baixa germinação. É válido destacar que processos como os de extensa domesticação e de melhoramento genético têm ostensivamente removido a dormência, no sentido de selecionar aquelas plantas que acabam por germinar mais e melhor, apesar de ser natural que em condições ambientais adversas a dormência possa reaparecer (BEWLEY, 1997).

Quanto à arquitetura foliar, o novo gene *GDW* mostrou afetar este caractere. Levanta-se a possibilidade de que a junção deste gene com *PTS* seja suficiente para explicar o recorte foliar típico de *S. galapagense*. Assim, para confirmar esta suspeita está em andamento a produção de duplos mutantes de *gdw* com *Pts*. Em relação à ação de *Sp* sobre a arquitetura foliar, ainda não foi possível mostrar que este gene atue sobre este caractere, porém não é descartada a possibilidade de o recorte foliar característico de *S. galapagense*, e claramente identificado em BC₁F₃ (figura 9 B), seja a junção dos três alelos *Pts*, *gdw* e *Sp*.

Por fim, foi descoberto e provado que o novo locus *gdw* é o principal responsável pelo nanismo característico de *S. galapagense*. De certo modo, além desta informação ajudar no esclarecimento da base genética das características típicas e peculiares de *S. galapagense*, há a questão da aplicação desses caracteres para utilidade agrônômica. Isto significa explorar a vantagem oferecida por uma planta de comprimento de entrenó curto, que não é uma mutação ligada a GA, e que é de grande importância para a agricultura e economia mundiais. É importante deixar claro que o novo gene, por nós descoberto, não se refere a algum tipo de mutação em GA. Existem mutações conhecidas, como a série *gib1*, *gib2*, *gib3*, deficitária em GA (KOORNNEEF et al., 1990). A deficiência de GA nos mutantes *gib* implica baixas taxas de germinação de sementes, o que é bastante deletério para a agricultura. Tampouco os mutantes *gib* possuem um bom desenvolvimento de frutos, já que GA é necessário para a expansão das células do ovário

que dará origem ao fruto de tomateiro (SERRANI et al., 2007). Pelo fato de *gdw* não estar ligado a GA, apresentando germinação normal, ou seja, tal como o controle MT, ele não possui os aspectos deletérios dos mutantes *gib*. Desse modo, *gdw* tem potencial para ser utilizado no melhoramento de tomateiro. É interessante lembrar que, tal qual o impacto da Revolução Verde em variedades de trigo e arroz (SILVERSTONE; SUN, 2000), um menor crescimento vegetativo do tomateiro pode deslocar o dreno para formação de frutos maiores, como foi por nós demonstrado recentemente com aplicações de paclobutrazol, um inibidor da biossíntese de GA, em períodos específicos do desenvolvimento da cultivar MT (FARINHA, 2008). Além disso, no caso da produção de tomate de mesa sob cultivo protegido, vem se buscando justamente plantas com entrenós mais curtos, para otimizar o uso do espaço nas onerosas casas de vegetação.

3 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi mostrado que a germinação, o nanismo e a arquitetura foliar característicos de *S. galapagense* podem ser controlados por três alelos, sendo os dois já conhecidos *Pts* e *Sp*, e o terceiro por nós descoberto e chamado *gdw*. Foi possível concluir que *Pts* não apenas afeta a arquitetura foliar, mas pela primeira vez, demonstrou-se que o alelo de *Pts* vindo de *S. galapagense* é capaz de afetar germinação e altura da planta. Desse modo, *Pts* mostrou afetar as três características que são controladas por GA. Este dado é coerente com a recente descoberta de que *Pts* é um *KNOX*, os quais são reguladores da enzima de biossíntese de GA, GA₂₀ oxidase.

Por outro lado, o alelo *Sp* não contribui para incremento na altura de maneira significativa e nem para alterações em características de recorte foliar, porém afeta positivamente as taxas de germinação.

Por fim, foi esclarecido que, de fato, existe outro (s) gene (s) em *S. galapagense* controlando algumas dessas características. Neste caso, *gdw*, reduz a altura em *S. galapagense* e contribui para acentuar o recorte foliar, porém sem afetar a germinação das sementes. Desta forma, revelou-se que, quando isolado em MT, o alelo *gdw* não afeta GA, já que não afeta germinação. É possível que *S. galapagense* tenha outros genes diferentes de *Pts* que afetem a germinação.

Entende-se que o recorte foliar típico observado em *S. galapagense* não pode ser atribuído somente a *Pts*, mas sim à junção da ação de *Pts* e *gdw*, indicando que o recorte foliar observado em *S. galapagense* seja atribuído a ação de pelo menos dois *loci*.

O esquema mostrado na figura 22 sintetiza de maneira objetiva as principais conclusões obtidas relacionando cada um dos três *locus* estudados aos fenótipos passíveis de alterações.

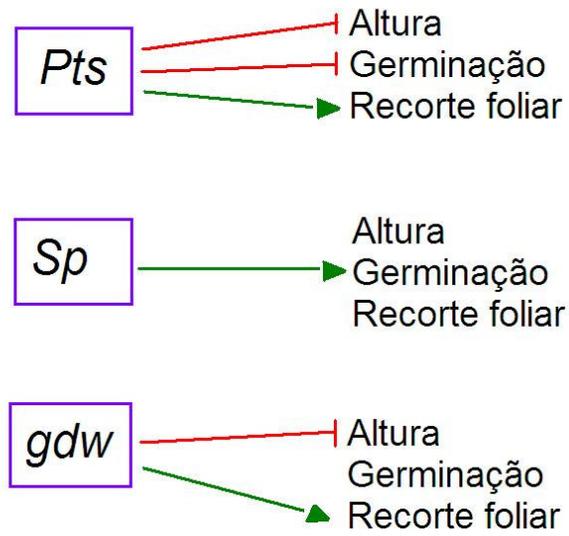


Figura 22 – Esquema representativo dos genes avaliados e as respostas fisiológicas por eles afetadas. Setas indicam promoção da resposta e símbolo “T” indicam inibição. Os efeitos representados aqui são relativos aos alelos presentes em *S. galapagense*

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALVEY, L.; HARBERD, N.P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 123, p. 153-160, 2005.
- BENSEN, R.J.; ZEEVAART, J.A.D. Comparison of ent-kaurene synthetase A and B activities in cell-free extracts from young tomato fruits of wild-type and *gib-1*, *gib-2* and *gib-3* tomato plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 9, p. 237-242, 1990.
- BEWLEY, J.D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1055-1066, 1997.
- BISHOP, G.J.; NOMURA, T.; YOKOTA, T.; HARRISON, K.; NOGUCHI, T.; FUJIOKA, S.; TAKATSUTO, S.; JONES, J.D.G.; KAMIYA, Y. The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 1761-1766, 1999.
- BURBIDGE, A.; GRIEVE, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; MCCARTY, D.R.; TAYLOR, I.B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, p. 427-431, 1999.
- CAMPOS, M.L. **Controle hormonal da defesa à herbivoria em tomateiro**. 2009. 117 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- CARVALHO, R.F. **Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- CHILD, A. A synopsis of *Solanum* subgenus *Potatoe* (F. Don) D'Arcy section *Tuberarium* (Dun.) Bitter (s.l). **Feddes Repertorium**, Santiago, v. 101, p. 209-235, 1990.
- CORRELL, D.S. **The potato and its wild relatives**. Renner: Texas Research Foundation, 1962. 471 p.
- D'ARCY, W.G.. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE, M.; ESTRADA, N. (Ed.). **Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution**. London: The Royal Botanic Gardens Kew, 1991. p. 75-137.
- DARWIN, S.C.; KNAPP, S.; PERALTA, I.E. Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). **Systematics and Biodiversity**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 29-53, 2003.

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

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

DUNAL, M.F. **Histoire naturelle, médicale et économique des Solanum**. Paris: Amand Koenig, 1813. 248 p.

_____. *Solanaceae*. In: DE CANDOLLE, A.P. (Ed.). **Prodromus systematics naturalis regni vegetabilis**. Paris, De Candolle AC (ed) 1852. v. 13, n. 1, 690 p.

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

FARINHA, T.B. **Envolvimento da giberelina na regulação do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom**. 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FOSBERG, F.R.. New nomenclatural combination for Galapagos plant species. **Phytologia**, Austin, v. 62, p. 181-183, 1987.

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

GEIST, D. On the emergence and submergence of the Galápagos Islands. **Notícias de Galápagos**, Galápagos, v. 56, p. 5-9, 1996.

GRAY, R.A. Alterations of leaf size and shape and other changes caused by gibberellins in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, p. 674-682, 1957.

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

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

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A.L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, n. 12, p. 523-530, 2000.

HICKS, G.R.; RAYLE, D.L.; LOMAX, T.L. The *diageotropica* mutant of tomato lacks high specific activity auxin binding sites. **Science**, Washington, v. 245, p. 52-54, 1989.

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

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

HUNZIKER, A.T. **Genera *Solanacearum***: the genera of *Solanaceae* illustrated, arranged according to a new system. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag Kommanditgesellschaft, 2001. 500 p.

IMBER, D.; TAL, M. Phenotypic reversion of *Flacca*, a wilted mutant of tomato, by abscisic acid. **Science**. Washington, v. 169, n. 3945, p. 592-593, 1970.

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

JACKSON, D.; VEIT, B.; HAKE, S. Expression of maize *KNOTTED1* related *homeobox* genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. **Development**, Washington, v. 120, p. 405-413, 1994.

JANSEN, R.C. Complex plant traits: time for polygenic analysis. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, p. 89-94, 1996.

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

KIM, M.; CANIO, W.; KESSLER, S. & SINHA, N. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. **Science**, Washington, v. 293, p. 287-289, 2001.

KIMURA, S.; KOENIG, D.; KANG, J.; YOONG, F.Y.; SINHA, N. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. **Current Biology**, London, v. 18, p. 672-677, 2008.

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

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

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

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

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

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.V.O.; 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.

LINNAEUS, C. **Species plantarum**. Holmiae: Ruggell, Lautentii Salvii, 1753. 2 v.

LONG, J.A.; MOAN, E.I.; MEDFORD, J.I.; BARTON, M.K. A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the SHOOTMERISTEMLESS gene of *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 379, p. 66-69, 1996.

LUCKWILL, L.C. **The genus *Lycopersicon***: an historical, biological and taxonomic survey of the wild and cultivated tomatoes. Aberdeen: Aberdeen University, 1943. 44 p. (Aberdeen University Studies, 120).

MACKBRIDE, J.F. *Solanaceae*. **Publications of the Field Museum of Natural History, Botany Series**, Flora of Peru, Chicago, v. 13, n. 5B, p. 1-267, 1962.

MAO, L.; BEGUM, D.; CHUANG, H-W.; 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.

MARTI, 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.

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 new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

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.

MULLER, C.H. **A revision of the genus *Lycopersicon***. Washington: USDA, 1940. 29 p. (USDA. Miscellaneous Publication, 382).

NEE, M. Synopsis of *Solanum* in the new world. In NEE, M.; SYMON, D.E.; LESTER, R.N.; JESSOP, J.P. (Ed.). ***Solanaceae IV***. Kew: The Royal Botanic Garden, 1999. p. 285-333.

NISHIMURA, A.; TAMAOKI, M.; SATO, Y.; MATSUOKA, M.. The expression of tobacco *Knotted1*- type class 1 *homeobox* genes correspond to regions predicted by the cytohistological zonation model. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 337-347, 1999.

ORI, N.; ESHED, Y.; CHUCK, G.; BOWMAN, J.L.; HAKE, S. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. **Development**. Washington, v. 127, p. 5523-5532, 2000.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**, Córdoba, v. 28, n. 1, p. 45-54, 2000.

_____. Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). **American Journal of Botany**, New York, v. 88, n. 10, p. 1888-1902, 2001.

PHINNEY, B.O. The history of gibberellins. In: CROZIER, A. (Ed.). **The biochemistry and physiology of gibberellins**. New York: Praeger Publ., 1983. v. 1, p. 19-52.

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. 73 p. 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.; ZSOGON, 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, n. 821, p. 63-72, 2009.

PIOTTO, F.A. **Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**. 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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

PNUELI, L.; CARMEL-GOREL, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J.; GANAL, M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. **Development**, Washington, v. 125, p. 1979-1989, 1998.

RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetics diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 275-279. 1993.

RICK, C.M. *Petroselinum (Pts)*, a new marker for chromosome 6. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, Davis, v. 30, p. 32, 1980.

_____. Molecular markers as aids for germoplasm management and use in *Lycopersicon*. **Horticultural Science**, London, v. 23, p. 55-57, 1988.

RICK, C.M.; BOWMAN, R.I. Galápagos tomatoes and tortoises. **Evolution**, Lancaster, v. 15, p. 407-417, 1961.

RICK, C.M.; LATERROT, H.; PHILOUZE, J. A revised key for the *Lycopersicon* species. **Tomato Genetic Cooperative Report**, Davis, v. 40, p. 31, 1990.

RONEN, G.; CARMEL-GOREN, L.; ZAMIR, D.; HIRSCHBERG, J. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 11102-11107, 2000.

ROSIN, F.M.; HART, J.K.; HORNER, H.T.; DAVIES, P.J.; HANNAPEL, D.J. Over expression of a knotted-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 106-117, 2003.

SAKAMOTO, T.; KAMIYA, N.; UEGUCHI-TANAKA, M.; IWAHORI, S.; MATSUOKA, M. *KNOX* homeodomain protein directly suppresses the expression of gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 581-590, 2001.

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 United States of America**, Washington, v. 96, n. 1, p. 290-295, 1999.

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

SEITHE, A. Die Haararten der Gattung *Solanum* L. Und ihre taxonomische Verwertung. **Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie**, Wien, v. 81, p. 261-336, 1962.

SENTOKU, N.; SATO, Y.; KURATA, N.; ITO, Y.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Regional expression of the Rice kn-1 type homeobox gene family during embryo, shoot, and flower development. **Plant Cell**, Baltimore, v. 11, p. 1651-1664, 1999.

SERRANI, J.C.; SANJUAN, R.; RUIZ-RIVERO, O.; FOS, M.; GARCIA-MARTINEZ, J.L. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 246-257, 2007.

SILVERSTONE, A.L.; SUN, T.P. Gibberellins and the green revolution. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 1-2, 2000.

SINHA, N.R.; WILLIAMS, R.E.; HAKE, S. Overexpression of the maize homeobox gene *KNOTTED1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 7, p. 787-795, 1993.

SPOONER, D.M.; PERALTA, I.E.; KNAPP, S. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. **Taxon**, Utrecht, v. 54, p. 43-61, 2005.

SYMON, D.E. The *Solanaceae* genera *Browallia*, *Capsicum*, *Cestrum*, *Cyphomandra*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nierembergia*, *Physalia*, *Petunia*, *Salpichroa*, *Withania* naturalized in Australia, **Journal of the Adelaide Botanical Garden**, Adelaide, v. 3, p. 133-166, 1981.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: Artmed, 2004. 719 p.

TANAKA-UEGUCHI, M.; ITOH, H.; OYAMA, N.; KOSHIOKA, M.; MATSUOKA, M. Overexpression of a tobacco homeobox gene encoding GA₂₀ oxidase. **Plant Journal**, Oxford, v. 15, p. 391-400, 1998.

TAYLOR, I.B. Biosystematics of the tomato. In: ATHERTON, J.G.; RUDICH, J. (Ed.). **The tomato crop**. New York: Chapman and Hall, 1986. chap. 1, 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.

VALE, F.X.R.; FERNANDES FILHO, E.I.; LIBERATO, J.R. QUANT: a software plant disease severity assessment. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 8., 2003, Christchurch. Christchurch: New Zealand, 2003. p. 105.

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

VREBALOV, J.; RUEZINKY, D.; PADMANABHAN, V.; WHITE, R.; MEDRANO, D.; DRAKE, R.; SCHUCH, W.; GIOVANNONI, J. A mads-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. **Science**, Washington, v. 296, p. 343-346, 2002.

WETTSTEIN, R.V. *Solanaceae*. **Die Naturlichen Pflanzenfamilien IV**, Berlin, v. 3b, n. 65, p. 4-38, 1891.

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

WILLIAMS, W.G.; KENNEDY, G.G.; YAMAMOTO, R.T.; THACKER, J.D.; BORDNER, J. 2-tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. **Science**, Washington, v. 207, p. 888, 1980.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)