

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS,  
ANATÔMICAS E ULTRA-ESTRUTURAS DE  
MICROTOMATEIROS FITOCROMO-  
MUTANTES**

**HYRANDIR CABRAL DE MELO**

**2007**

**HYRANDIR CABRAL DE MELO**

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E ULTRA-  
ESTRUTURAIS DE MICROTOMATEIROS FITOCROMO-  
MUTANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do programa  
de pós-graduação em Agronomia/Fisiologia  
Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**HYRANDIR CABRAL DE MELO**

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E ULTRA-  
ESTRUTURAIS DE MICROTOMATEIROS FITOCROMO-MUTANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 23 de julho de 2007.

Dra. Nidia Majerowicz	UFRRJ
Dr. Antonio Chalfun Junior	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA
Dr. Rovilson José de Souza	UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2007. 61p. Tese

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Melo, Hyrandir Cabral de.

Características fisiológicas, anatômicas e ultra-estruturais de  
microtomateiros fitocromo-mutantes. / Hyrandir Cabral de Melo. –  
Lavras : UFLA, 2007.

61 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. anatomia. 2. fisiologia. 3. fitocromo. 4. fotomorfogênese. 5. tomateiro. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.7904497

A todas as pessoas interessadas no estudo da  
vida,

**OFEREÇO**

Ao Poder Primordial que cria, coordena a evolução e  
que nos faz parte do Todo,

**DEDICO**

“Conhecimento real é saber a extensão da própria  
ignorância”

(Confúcio)

## AGRADECIMENTOS

A Shri Mataji Nirmala Devi, pelo apoio e suporte constante na minha condução ao autoconhecimento.

Aos meus pais e irmãos, seres fundamentais para a formação de minha identidade.

Aos professores e colegas do ensino fundamental, médio e superior, que me ajudaram a perceber a importância do conhecimento como um potencial agente modificador do “si” e da sociedade.

A todos que lutaram e lutam pela qualidade da educação no Brasil; ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras e ao CNPq, órgão concessor da bolsa de estudos.

Ao corpo de professores e estudantes do setor de Fisiologia Vegetal, UFLA.

Ao meu orientador, Evaristo Mauro de Castro, pelo apoio e confiança prestados a mim.

À professora Ângela Maria Soares, pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos colegas Cynthia de Oliveira e Fabiano J. Perina (UFLA), pela ajuda durante o experimento e realização das análises; ao professor Lázaro Perez e Rogério F. Carvalho (ESALQ) pela concessão das sementes.

Ao professor Eduardo Alves, pela ajuda prestada nas análises de microscopia eletrônica.

A todas as pessoas, do presente ou do passado, com as quais mantive contato, pela aprendizagem de vida.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Fotorreceptores.....	5
2.2 Micro-tomateiros e tomateiros fitocromo-mutantes .....	7
2.3 Aspectos estruturais de plantas fitocromo-mutantes.....	10
2.4 Aspectos fisiológicos de plantas fitocromo-mutantes.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1 Material vegetal.....	13
3.2 Condução do experimento.....	13
3.3 Características avaliadas.....	14
3.3.1 Características estruturais.....	14
3.3.1.1 Características anatômicas.....	14
3.3.1.2 Características ultraestruturais.....	16
3.3.1.2.1 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	16
3.3.1.2.2 Ultramicrotomia.....	17
3.3.1.2.3 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	17
3.3.2 Características biofísicas.....	18
3.3.3 Características bioquímicas.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Características estruturais.....	21
4.1.1 Características anatômicas .....	21
4.1.2 Características ultraestruturais.....	30
4.2 Características fisiológicas.....	38
4.2.1 Características biofísicas.....	38
4.2.2 Características bioquímicas.....	40

4.3 Considerações finais.....	49
5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

## RESUMO

MELO, Hyrandir Cabral de. **Características fisiológicas, anatômicas e ultra-estruturais de microtomateiros fitocromo-mutantes.** 2007. 61p. Tese (Doutorado em Agronomia. Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*

O uso de microtomateiros fitocromo-mutantes é uma estratégia para o estudo do papel dos fitocromos sobre o desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais em microtomateiros (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fitocromo-mutantes. A cultivar Micro-Tom (MT) e os mutantes *aurea* (subexpressa fitocromos), *atv* e *hpl* (ambos superexpressam eventos mediados por fitocromos) foram cultivados em condições controladas de luz e temperatura e caracterizados no estágio de floração. O mutante *hpl* obteve a maior densidade estomática na epiderme adaxial (EAd). Na epiderme abaxial (EAb), a cultivar MT obteve a menor densidade estomática. Densidade de células foi maior no mutante *aurea* na EAd e menor no mutante *atv* na EAb. O índice estomático foi maior nos mutantes *hpl* e *atv* na EAd e na EAb somente no mutante *atv*. Os mutantes *aurea* e *hpl* obtiveram maiores diâmetros polar e equatorial dos estômatos na EAd, enquanto que somente o mutante *aurea* obteve maiores diâmetros na EAb. A menor densidade de tricomas não glandulares na epiderme EAd foi observada nos mutantes *hpl* e *atv*. Maior espessura na EAd foi observada nos mutantes *hpl* e *atv* e somente no mutante *atv* para EAb. O mutante *hpl* obteve a maior espessura do parênquima paliçádico (PP) e esponjoso enquanto que o *aurea* a menor espessura do PP. A maior área de amido por cloroplasto foi observada no mutante *hpl* e *atv* e a menor área no mutante *aurea*. O mutante *atv* obteve o maior número de cloroplasto por célula no parênquima paliçádico. O mutante *hpl* obteve as maiores taxas de fotossíntese potencial, enquanto o *aurea* manteve taxas similares à da cultivar MT. O maior conteúdo de clorofilas a e b foi observado no mutante *atv* e também a menor razão clorofila a/b; o mutante *aurea* expressou os menores conteúdos de clorofilas. O mutante *aurea* obteve os maiores conteúdos de nitrogênio total e proteínas totais, enquanto *atv* os menores conteúdos. Os mutantes *aurea* e *hpl* obtiveram os menores conteúdos de açúcares solúveis totais. O conteúdo de carotenóides totais foi maior no mutante *hpl*. Conclui-se que as características estudadas são fortemente influenciadas por fitocromos.

---

\* Comitê Orientador: Prof. Evaristo Mauro de Castro - UFLA (Orientador), Profa. Ângela Maria Soares – UFLA, Prof. Eduardo Alves – UFLA.

## ABSTRACT

MELO, Hyrandir Cabral de. **Physiological, anatomical and ultra-structural characteristics of micro-tomato phytochrome-mutants**. 2007. 61p. (Thesis - Doctor in Agronomy/Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The use of micro-tomato is a strategy to study the role of phytochrome on plant development. The aim of this work was to characterize physiological, anatomical and ultra-structural aspects in micro-tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) phytochrome-mutants. Plants of Micro-Tom (MT) cultivar and *aurea* (sub express phytochrome), *atropurpurea* (*atv*) and *hp1* (both super express phytochrome events-mediated) mutants were cultivated under controlled light and temperature and evaluated in flowering stage. The *hp1* mutant obtained the highest stomatal density in adaxial epidermis (EAd). In abaxial epidermis (EAb) MT cultivar showed the smallest density. Cells density was increased in *aurea* mutant in EAd and decreased in EAb of *atv* mutant. Stomatal indices increased in EAd of *hp1* and *atv* mutants and only in EAb of *atv*. Polar and equatorial diameters of stomatas were greater in EAd of *aurea* and *hp1* mutants but only *aurea* had the higher diameter in EAb. *hp1* and *atv* mutants had less density of non-glandular trichomes in EAd. *hp1* and *atv* mutants had increase in EAd thickness but only *atv* in EAb thickness. *hp1* increased palisade parenchyma (PP) and lacunose parenchyma and *aurea* mutant had the smallest thickness of PP. *hp1* and *atv* mutants had the highest area of starch per chloroplast and *aurea* mutant had the smallest area. *atv* had the highest number of chloroplast per cell in the palisade parenchyma. The *hp1* mutant had the highest rates of potential photosynthesis and *aurea* maintained similar rates as MT cultivar. The highest chlorophyll content was observed in *atv*, and also the smallest ration of a/b chlorophyll; *aurea* expressed the smallest chlorophyll content. *aurea* mutant had the highest total nitrogen and total soluble protein content, while *atv* had the smallest content. Total soluble sugars concentration was smaller in *aurea* and *hp1* mutants. Total carotenoids content were highest in *hp1*. The characteristics studied are strongly influenced by phytochromes.

---

\* Guidance Committee: Prof. Evaristo Mauro de Castro- UFLA (Major Professor), Prof. Ângela Maria Soares - UFLA, Prof. Eduardo Alves - UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

Plantas mutantes em fitocromo têm sido recentemente utilizadas como modelo para o estudo dos complexos efeitos da radiação solar sobre o desenvolvimento vegetal.

Devido à presença de distintos e específicos fotorreceptores vegetais para diferentes faixas do espectro de radiação solar e a interação de todos os fotorreceptores até então caracterizados, pouco se conhece dos efeitos isolados de cada faixa espectral sobre o desenvolvimento da planta como um todo. O uso de plantas que subexpressam ou superexpressam fitocromos, ou que têm mutações na via de transdução de sinais a partir desses fotorreceptores, facilita o estudo isolado da radiação solar na faixa espectral do vermelho (V) e vermelho-distante (VD) sobre processos vegetais que dependem dessa radiação.

Tomateiro e *Arabidopsis thaliana* têm sido as espécies mais utilizadas em estudos de fotomorfogênese e, recentemente, microtomateiros têm sido indicados como modelo para esses estudos. Baixo porte da planta, curto ciclo de vida, presença de tecidos que facilitam análises bioquímicas e uma diversidade de metabólitos secundários são fatores determinantes na indicação de microtomateiros como modelo para estudos fisiológicos.

Faz-se necessário um estudo de caracterização estrutural e fisiológica dos microtomateiros, selvagens e fitocromo-mutantes, para um melhor entendimento do seu processo de desenvolvimento, assim como da participação dos fitocromos nesse processo. Mesmo em tomateiros fitocromo-mutantes de porte elevado, raros são os estudos desenvolvidos sobre a anatomia e a ultra-estrutura vegetal, apesar de sua dependência para um melhor entendimento dos processos fisiológicos.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais em microtomateiros (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fitocromo-mutantes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fotorreceptores

As plantas utilizam diferentes fotorreceptores para perceberem mudanças na qualidade e na intensidade de radiação e, assim, regularem diferentes processos do seu desenvolvimento. Os fotorreceptores conhecidos são sensíveis à radiação UV-B, azul/UV-A e vermelho/vermelho distante (V/VD) da radiação solar incidente.

A faixa espectral do azul regula uma variedade de processos fisiológicos em plantas e também em animais, sendo conhecidos e caracterizados os criptocromos e as fototropinas como os fotorreceptores para esse espectro de radiação. Os fotorreceptores que absorvem os espectros na região do vermelho/vermelho distante (V/VD) são os fitocromos, os quais regulam muitos processos fisiológicos, dentre os quais, a germinação de sementes, evitação à sombra e transição para o florescimento (Sharma, 2001).

O fitocromo é uma proteína solúvel composta de uma molécula de pigmento azul, a fitocromobilina (cromóforo) e uma cadeia polipeptídica, a apoproteína que, juntos, formam a holoproteína. São conhecidos cinco genes, de *PHYA* a *PHYE*, que codificam, respectivamente, as apoproteínas de *PHYA* a *PHYE* e estas, quando unidas ao cromóforo, constituem as cinco espécies de fitocromo, *phyA* a *phyE*. Muitas funções das diferentes espécies de fitocromos são redundantes, no entanto, sua regulação sobre diferentes processos da planta pode diferir quanto ao estágio de desenvolvimento do vegetal, assim como nos diferentes órgãos (Tóth et al., 2001).

Com base na estabilidade quanto à luz, os fitocromos têm sido caracterizados em dois tipos. O tipo I é fotolábil, se degradando rapidamente sob exposição luminosa e se acumula em plântulas estioladas. O *phyA* tem sido a

única espécie descrita como fazendo parte do fitocromo tipo I. O tipo II é considerado fotoestável e é constituído pelos demais tipos de fitocromo (Sharrock & Clack, 2002).

As respostas ao fitocromo têm sido divididas em diferentes classes, baseadas na energia de radiação requerida para a obtenção de determinada resposta, as quais são consideradas de baixa fluência de radiação (LFRs, de *low fluence responses*), muito baixa fluência de radiação (VLFRs, de *very low fluence responses*) e respostas de alta irradiância (HIRs, de *high irradiance responses*) (Shinomura et al., 2000)

LFRs são clássicas no estudo de fitocromo pela marcante característica da fotorreversibilidade da resposta em função do último espectro de radiação fornecido, V ou VD. VLFRs não são fotorreversíveis e são muito sensíveis a um amplo espectro de radiação de 300 a 780 nm. HIRs requerem prolongada e alta frequência de radiação para causar resposta. O *phyA* é o responsável pelas VLFRs e VD-HIRs e o *phyB* é o mais proeminente dos fitocromos do tipo II responsáveis por LFR e V-HIRs durante a fotomorfogênese (Quail, 2002).

A fotorreversibilidade do fitocromo é bastante conhecida e é a característica mais marcante da holoproteína. Esse fenômeno foi encontrado apenas em uma outra proteína fotorreceptora chamada de supercromo, a qual apresenta características de fitocromo e fototropina (Briggs & Olney, 2001). A fotorreversibilidade em fitocromos compreende duas formas desse fotorreceptor, uma biologicamente ativa (Fve) e uma inativa (Fv). A forma inativa absorve o comprimento de onda do V, sendo convertida à forma biologicamente ativa. A reversão à forma inativa ocorre pela absorção do espectro de radiação VD pelo Fve, passando, assim, à forma Fv. No entanto, essa conversão não é total, ocorrendo em 97% dos fitocromos que estavam na forma Fve à forma Fv, enquanto que o espectro do V converte 85% de Fv para a forma Fve. A reversão de Fve a Fv pode também ocorrer no escuro, devido à presença do espectro VD

nessa condição do ambiente. Apesar da efetividade da conversão dos fitocromos em suas duas formas pela radiação V e VD, sabe-se que o espectro do azul pode converter Fv a Fve, porém, de forma bem menos eficiente em termos quantitativos que a radiação no espectro do V.

Tem sido demonstrado que alguns processos fisiológicos são dependentes e ou regulados tanto por fitocromos quanto por criptocromos. Os fitocromos A e B, que aumentam a resposta ao fototropismo em *Arabidopsis*, em baixa e alta fluência de luz respectivamente, são desencadeados pela percepção à luz azul (Janoudi et al., 1997). A presença de fitocromo, interagindo com fotorreceptores de luz azul (fototropinas) no movimento de cloroplastos e fototropismo, que são eventos tipicamente conhecidos como sendo em resposta à luz azul (Kasahara et al., 2004; Srinivas et al., 2004), tem reafirmado a complexa inter-relação entre os diferentes fotorreceptores nos processos vegetais dependentes de radiação luminosa, além das interações já bem caracterizadas, como no caso da indução do florescimento.

Além da interação entre os diferentes fotorreceptores, a temperatura e o fotoperíodo modulam significativamente a ação dos fotorreceptores (Halliday et al., 2003).

## 2.2 Microtomateiros e tomateiros fitocromo-mutantes

O uso de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como modelo para estudos fisiológicos possui vantagens em relação ao uso de *Arabidopsis thaliana*, como a diversidade de metabólitos secundários (Tanksley et al., 1992), tecidos que facilitam análises bioquímicas, além do padrão morfogenético (Pratt et al., 1997). No entanto, o elevado porte das plantas e o longo ciclo de vida aparecem como desvantagens em relação a *Arabidopsis*.

A cultivar em miniatura Micro-Tom (MT) foi proposta por Meissner et al. (1997) como um modelo genético, que produz frutos e sementes viáveis e

pode ser cultivada em vasos de 50-150 mL de substrato, completando seu ciclo de vida entre 70 a 90 dias. Dessa forma, ela supera as desvantagens do cultivo de tomateiro em relação a *Arabidopsis*, quanto à necessidade de espaço físico e ciclo de vida das plantas. Atualmente, ‘MT’ tem sido proposta como a cultivar preferencial para pesquisas em âmbito molecular em tomateiro (Martí et al., 2006).

A cultivar MT foi produzida inicialmente para finalidades ornamentais pelo cruzamento de duas cultivares anãs, a ‘Florida Basket’ e a ‘Ohio-4013-3’, dando-lhe característica de planta em miniatura, a qual apresenta frutos pequenos e vermelhos quando maduros (Scott & Harbaugh, 1989). O fenótipo anão da cultivar MT não ocorre em função de deficiência em giberelina, uma vez que o nível desse hormônio é comparativamente similar ao de cultivares de porte elevado. No entanto, a ação da giberelina nesse genótipo depende de ação sinérgica de brassinosteróides e a cultivar MT traz mutação no gene que codifica a biossíntese desse hormônio (Martí et al., 2006).

Tem-se, para o tomateiro, uma série de mutantes em fitocromo, que têm sido bem caracterizados em âmbito fisiológico e genético. Processos de fotomorfogênese podem ser investigados utilizando-se esses mutantes, que podem ser específicos para síntese de fotorreceptores ou para via de transdução de sinais e, assim, elucidar processos fisiológicos diretamente ou indiretamente dependentes de luz (Van Tuinen et al., 1997).

O mutante mais estudado é o *aurea*, o qual é deficiente no *pool* de fitocromo A (*phyA*) e na síntese de cromóforo, o que o torna deficiente em todas as espécies de fitocromo (Sharma et al., 1993). Alguns mutantes são deficientes em espécies específicas de fitocromo, como o mutante *fri*, o qual é deficiente em *phyA* (Van Tuinen et al., 1995) e o mutante *tri*, deficiente em fitocromo B (*phyB*) (Kerckoffs et al., 1999). O mutante *high pigment1* (*hp1*) e *atroviolacea* (*atv*) apresentam mutação na via de transdução de sinais, expressando

hipersensibilidade de respostas em processos mediados por fitocromo (Peters et al., 1998). Alguns mutantes apresentam múltiplas combinações dos mutantes simples, como o *aureahp*, *frihp1* e *fritri* (Srinivas et al., 2004).

O mutante *aurea* tem deficiência na atividade da enzima fitocromobilina sintase, responsável pela conversão de biliverdina a fitocromobilina no processo de síntese do cromóforo. Plântulas crescidas sob luz branca têm o desenvolvimento do cloroplasto danificado e níveis de clorofila e antocianina reduzidos (Koorneef et al., 1985). Plantas adultas são menos deficientes em fitocromo que plântulas, mas mesmo assim seu nível de fitocromo é aproximadamente 50% menor que plantas do tipo selvagem, apresentando um aspecto amarelo-ouro, motivo de sua denominação *aurea* (Koorneef et al., 1985; López-Juez et al., 1990).

A síntese de fitocromo nos mutantes *hp1* e *atv* ocorre normalmente, sem alteração da apoproteína ou cromóforo, indicando que a alteração ocorre na via de transdução de sinais, causando hipersensibilidade de respostas à radiação (Kerckhoffs et al., 1997). Esses mutantes exibem alta pigmentação no caule, folha e frutos (Kendrick et al., 1994). A denominação *high pigment* ocorre em função de níveis mais elevados que os do selvagem de carotenos ( $\beta$ -caroteno, licopeno), carotenóides (xantofilas) e clorofila (Thompson et al., 1962; Kendrick et al., 1997; Peters et al., 1998). Altos níveis de antocianina e clorofila também são encontrados no mutante *atv* e baixas temperaturas contribuem para o aumento no nível de antocianina no caule, folhas e frutos imaturos (Rick et al., 1974).

Apesar de os mutantes *hp1* e *atv* terem amplificados os níveis de antocianina, se comparados ao selvagem, têm-se observado diferenças na amplificação dessa resposta em relação às exigências de radiação. O mutante *hp1* exibe amplificação em ambos, baixa e alta fluência de radiação, enquanto que a amplificação no mutante *atv* é comparativamente muito maior em

condições de alta fluência de radiação em relação ao *hp1* (Kerckhoffs et al., 1997, Huub et al., 1997). Uma vez que a amplificação de *atv* é dependente de alta fluência de radiação, sugere-se que essa resposta fisiológica dependa muito mais de *phyB* do que de *phyA*, diferentemente do mutante *hp1*, para o qual os dois tipos de fitocromos estão envolvidos na amplificação da síntese de antocianina (Kendrick et al., 1997).

Microtomateiros fitocromo-mutantes têm sido caracterizados quanto à sua competência para regeneração *in vitro* (Carvalho, 2003). Mutantes simples e múltiplos em fitocromo de tomateiro também têm sido estudados quanto a aspectos fisiológicos envolvidos com fotomorfogênese, como fototropismo e movimento de cloroplastos (Srinivas et al., 2004). No entanto, estudos são necessários com relação à ultra-estrutura celular e à anatomia das plantas, assim como suas interações para com processos fisiológicos, visando um melhor entendimento do desenvolvimento vegetal como um todo.

### **2.3 Aspectos estruturais de plantas fitocromo-mutantes**

Kozuka et al. (2005) relataram que o controle da fotomorfogênese foliar é predominantemente determinado pelo *phyB* e criptocromos, para a percepção de luz V/VD e azul, respectivamente.

Poucas pesquisas relatam o efeito direto de fitocromos sobre a morfologia foliar. *Dara-5*, um mutante de tomate que superexpressa *phyB*, apresentou um aumento de 28% na densidade estomática em relação ao selvagem (Schittenhelm et al., 2004).

Resultados contraditórios têm sido reportados quanto à morfologia foliar envolvendo estudos de fitocromo. Robson et al. (1993) observaram que a área foliar em plantas de *Arabidopsis* deficientes em fitocromo B era maior que em plantas selvagens, tanto sob luz V quanto VD. No entanto, Kim et al. (2005)

e Reed et al. (1993) observaram que, nessas mesmas condições, a área foliar dos mutantes foi menor.

Tsukaya et al. (2002) observaram que o gene *PHYB* está envolvido no alongamento do pecíolo de *Arabidopsis thaliana*, uma vez que este está envolvido no processo de alongamento celular. No entanto, em condições de escuro, tem se observado que o *phyA* é o fotorreceptor que se encontra mais envolvido no estiolamento de plântulas e que media as respostas em muito baixa fluência de radiação de vermelho ou de vermelho distante, estando presente inclusive na ponta das raízes (Hall et al., 2001; Tóth et al., 2001). Além disso, o *phyA* é uma molécula fotolável, que se degrada rapidamente quando exposta à luz (Tóth et al., 2001).

#### **2.4 Aspectos fisiológicos de plantas fitocromo-mutantes**

O fitocromo é conhecido por estar envolvido no controle transcricional de um grande número de enzimas do maquinário fotossintético como aquelas ligadas às clorofila a e b e subunidades da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (rubisco) (Dale, 1988).

Buisson & Lee (1993), estudando diferentes balanços de radiação V:VD sobre o desenvolvimento de folhas de mamoeiro, observaram que a redução na razão V:VD, causou decréscimo na razão de clorofila a/b e aumento no conteúdo de clorofila total, quando comparada a uma alta radiação sem uso de filtro para o espectro do vermelho. No entanto, esse mesmo conteúdo foi menor em relação às plantas do tratamento com uso de filtro para os dois espectros (V e VD) sem que houvesse alteração do balanço V:VD. Dessa forma, a intensidade e a qualidade espectral causaram alteração no conteúdo de clorofila. Os autores atribuíram essas modificações a um presumível efeito do balanço espectral sobre o equilíbrio das diferentes espécies de fitocromo. Além desses resultados, Lee

(1988) também relata redução na razão clorofila a/b, em função de um enriquecimento do espectro VD em parreiras.

No mutante de tomateiro que superexpressa *phyB*, *Dara-5*, o teor de clorofila total foi superior ao do selvagem. A atividade fotossintética e a condutância estomática também foram maiores nessas plantas mutantes em período de crescimento, quando cultivadas em casa de vegetação, o que foi atribuído à maior densidade estomática desse mutante (Schittenhelm et al., 2004). Em concordância com esses resultados, Reed et al. (1993) observaram, em *Arabidopsis*, que plantas deficientes em *phyB* apresentavam uma menor concentração de clorofila e atribuíram essa menor concentração ao menor número de cloroplastos por célula.

Além das clorofilas, os carotenóides também são pigmentos envolvidos na absorção de luz e que estão presentes nos tilacóides. Poucos trabalhos relatam o efeito específico de fitocromos sobre a síntese de carotenóides, mas já se sabe que o mutante que superexpressa fitocromo *hp1* tem o conteúdo de carotenóides totais maior nos seus frutos que aqueles de plantas selvagens (Liu et al., 2004).

Kasperbauer & Hunt (1998) relatam que o fotoequilíbrio entre a absorção do V e VD pelos fitocromos, além de regular o desenvolvimento das plantas, também regula a alocação dos fotoassimilados.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal

Sementes dos microtomateiros selvagem e fitocromo-mutantes utilizados neste trabalho foram cedidas pelo professor Dr. Lázaro Perez, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP). Foram utilizados os microtomateiros cultivar Micro-Tom e seus mutantes em fitocromo *aurea*, *high pigment 1 (hp1)* e *atroviolacea (atv)*.

Características dos microtomaterios cultivar Micro-Tom e características estudadas em tomateiros, em função das mutações supracitadas, encontram-se no item 2.2.

### 3.2 Condução do experimento

O experimento foi conduzido no setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor, utilizando-se substrato Plantmax<sup>®</sup> e vermiculita, na proporção de 1:1 para enchimento das células. As bandejas ficaram acondicionadas em câmaras de crescimento com temperatura máxima de 30°C, mínima noturna de 19°C e radiação média de 142  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a partir de lâmpadas fluorescentes brancas e fotoperíodo de 16 horas, durante o período diurno. As bandejas foram regadas duas vezes ao dia, mantendo-se o substrato úmido.

Quinze dias após a semeadura, foram escolhidas 30 mudas de cada mutante e da cultivar MT, de acordo a similaridade em porte e vigor, que transplantadas para vasos plásticos de capacidade de 150 mL. O substrato do vaso foi composto de Plantmax<sup>®</sup> e vermiculita (1:1) e 0,5g de NPK, na

formulação 4-14-8, distribuído na borda de cada vaso. As plantas foram acondicionadas em câmaras de crescimento iluminadas com lâmpadas fluorescentes brancas, recebendo radiação média de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na altura do mesófilo das plantas adultas, com fotoperíodo de 16 horas durante o período diurno. A irrigação foi realizada duas vezes por dia, mantendo-se a umidade do substrato próximo à capacidade de campo. As câmaras de crescimento estavam localizadas em sala com ar condicionado e, no interior das câmaras, a temperatura máxima diária foi de  $32^{\circ}\text{C}$  e a mínima noturna de  $18^{\circ}\text{C}$ , medida na altura do mesófilo das plantas adultas, sendo a temperatura média de  $26^{\circ}\text{C}$ .

Após o transplântio das mudas, uma vez por semana, foi realizada adubação foliar das plantas, utilizando-se um borrifador manual com uma solução diluída 10 vezes a partir da solução estoque, composta de 7 g do composto nutricional de Peters 20-20-20 + 20 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  + 5 g de  $\text{MgSO}_4$  + 3 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  + água, até completar 1 litro.

Trinta dias após o transplântio, selecionaram-se plantas em estágio de floração, ainda sem a presença de frutos, para a realização das análises estruturais e fisiológicas.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado. Após análise de variância dos resultados obtidos, utilizou-se o teste de Tukey, a 5% de erro.

### **3.3 Características avaliadas**

#### **3.3.1 Características estruturais**

##### **3.3.1.1 Características anatômicas**

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA. Um dia após as análises biofísicas (31º dia após o transplântio das mudas), folíolos localizados na região

mediana da terceira folha completamente expandida, do ápice para a base da planta, foram retirados e fixados em FAA 70% (formaldeído + ácido acético + álcool etílico 70%) (Kraus & Arduim, 1997), durante 72 horas e, posteriormente, conservados em álcool 70% até o momento da realização das análises anatômicas.

Utilizou-se micrótomo de mesa para a obtenção de seções transversais do terço médio foliar. Secções paradérmicas foram obtidas manualmente no terço médio dos folíolos. Para clarificação das seções transversais, foram utilizadas água sanitária 5% (Kraus & Arduim, 1997) e uma mistura de azul de astra e safranina para a coloração dos tecidos (Kraus & Arduim, 1997). As seções paradérmicas foram coradas com solução de safranina 1% para facilitar a contagem das células. Glicerina 50% foi utilizada na montagem das lâminas semipermanentes.

Para as características densidade estomática, densidade de células da epiderme, número de tricomas e índice estomático, foram utilizadas folhas coletadas de 6 plantas de cada tipo de microtomateiro estudado e cada folha analisada em 4 campos. A contagem das células foi realizada com câmara clara e a densidade estomática foi determinada de acordo com metodologia de Labreau et al. (1961). O índice estomático (Si) foi calculado utilizando-se a fórmula:  $Si (\%) = (Sn / (Sn + Em)) \times 100$ , sendo Sn o número de estômatos e Em o número de células da epiderme (Cutter, 1986).

Para espessura dos tecidos da lâmina foliar, foram coletadas folhas de 6 plantas de cada tipo de microtomateiro estudado e observados três campos por folha. As determinações de espessura de tecidos e células foram realizadas utilizando-se uma ocular micrométrica acoplada em microscópio de luz Olympus BX-60.

### **3.3.1.2 Características ultra-estruturais**

As preparações e a observação das amostras para a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia de Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Dez células do parênquima paliçádico (o qual era constituído por uma única camada), escolhidas aleatoriamente, e dez células do parênquima lacunoso, também escolhidas aleatoriamente, foram selecionadas, em três plantas, para cada tipo de microtomateiro estudado, para realização da contagem do número de cloroplastos por células, do comprimento e largura dos cloroplastos, além de área dos cloroplastos, contagem do número de grãos de amido por cloroplastos e para a determinação da área total dos grãos de amido por cloroplasto.

#### **3.3.1.2.1 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Em três plantas, folíolos da região mediana da terceira folha completamente expandida, do ápice para a base da planta, foram coletados (no mesmo dia da coleta para análises anatômicas), cortados em pedaços de 1 mm de largura e 3 mm de comprimento e imersos em solução de fixação Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2) por um período de 24 horas. Depois, foram lavados em tampão cacodilato (três vezes de 10 min), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavados duas vezes durante 15 minutos em água destilada, transferidos para solução a 0,5% de acetato de uranila, permanecendo, durante 12 horas, a 4°C e, em seguida, lavados novamente em água destilada e

desidratados em gradiente crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por três vezes). Em seguida, o material foi transferido para gradientes crescentes de Spurr/acetona 30% (8 horas), 70% durante 12 horas e 100% duas vezes durante 24 horas cada. Posteriormente, foram montados em moldes e colocados para polimerizar em estufa, a 70°C, por 48 horas.

#### **3.3.1.2.2 Ultramicrotomia (MET)**

Os blocos obtidos foram levados a um aparelho de desbaste, para a retirada dos excessos e, posteriormente, desbastados com lâminas de barbear. Em seguida, secções semifinas (0,85 µm) e ultrafinas (<100 nm) foram cortadas usando-se um ultramicrotomo Reichert-jung (ultracut), com navalha de diamante. Os cortes semifinos foram coletados com anel de ouro, colocados em lâminas de vidro, aquecidos até a secagem da água e adesão à lâmina, coloridos com azul de toluidina (1 g azul de toluidina, 1 g borato de sódio e 100 mL água), filtrados em filtro Millipore (0,2 µm) e montados permanentemente em meio Permalt. Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de ouro *golden slot grids* e secos em raques de alumínio cobertos com formvar (Rowley & Moran, 1975). As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por 3 min cada e, em seguida, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

#### **3.3.1.2.3 Preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Fragmentos foliares de 3 mm<sup>2</sup> localizados na região do terço médio foliar foram retirados e fixados numa solução composta de glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2,5%) em tampão cacodilato, pH 7,0, 0,05 M + CaCl<sub>2</sub>

0,001M, por um tempo superior a uma hora, e mantidos sob refrigeração. Posteriormente, esses fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,05 M (três vezes de 10 minutos) e imersos em glicerol 30%, pelo tempo de 30 minutos. O material foi lavado em água destilada e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 M, por 1-2 horas, para posterior desidratação em gradiente de acetona (30, 50, 70 e 90 por 10 minutos e 3 vezes por 10 minutos em 100%). Em seguida, as amostras foram secadas ao ponto crítico, montadas nos *stubs* para sofrerem o procedimento de metalização com ouro e observação em microscópio eletrônico de varredura da marca Leo Evo 40 com aplicação do software Leoquif (Leo User Interface). Para o procedimento de montagem das pranchas e melhoria das imagens, foi utilizado o software Photoshop®.

### **3.3.2 Características biofísicas**

No 30º dia após o transplântio das mudas, foram realizadas avaliações de resistêntica estomática (*re*) e transpiração (*E*) no folíolo da região mediana da terceira folha completamente expandida, do ápice para a base da planta. Foram realizadas três avaliações, de quatro em quatro horas, após quatro horas do início do período de luz, utilizando-se de um porômetro (Licor LI-1600), em cinco plantas de cada tipo de microtomateiro e, posteriormente, os dados foram agrupados para a obtenção das médias.

Folíolos inseridos na mesma posição, nos quais foram realizadas as avaliações de *re* e *E*, foram utilizados para análises anatômicas, ultra-estruturais e bioquímicas.

O porômetro supracitado também foi utilizado para a medição da radiação incidente na superfície da bandeja de germinação e na região do mesófilo das plantas em diferentes dias durante a condução do experimento,

sendo os dados agrupados posteriormente para a obtenção das médias de radiação, as quais estão descritas no item 3.2.

Um dia após as avaliações de  $r_e$  e  $E$ , foram realizadas as avaliações de fotossíntese potencial ( $A_{pot}$ ), sendo utilizado o método de evolução de oxigênio (Delieu & Walker, 1983). Seções de área conhecida dos mesmos folíolos, de três plantas por tratamento, utilizados para  $r_e$  e  $E$ , foram utilizados para esta avaliação. As determinações de fotossíntese potencial foram realizadas à temperatura de 30°C e uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativa de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As determinações do cálculo da fotossíntese potencial e do volume da câmara foram obtidas empregando-se o método de injeção, considerando que 1 mL de ar contém 21% de  $\text{O}_2$  ou 9,369  $\mu\text{mol O}_2$  (Delieu & Walker, 1981; Walker & Walker, 1990). Considerou-se como capacidade fotossintética – ou fotossíntese potencial – a taxa de evolução do  $\text{O}_2$  fotossintético máxima, medida sob saturação da luz (Guidi et al., 2002).

### **3.3.3 Características bioquímicas**

No 32º dia após o transplante das mudas, folíolos (mesma localização do item 3.3.1.1) foram coletados e discos foliares retirados da região mediana do limbo foliar, excetuando-se a nervura central e as bordas do limbo foliar. Para análises de clorofilas e carotenóides, utilizou-se material foliar fresco, o qual, após coletado, foi conduzido ao laboratório, à temperatura de 4°C. Para as análises de proteínas, AST e N utilizou-se material seco. Folíolos para a determinação de todas as análises bioquímicas foram coletados quatro horas após o início do período de luz.

Para todas as análises bioquímicas, foram utilizadas três plantas por tratamento.

A metodologia de Kjeldahl (1883) foi utilizada para a determinação do teor de nitrogênio total foliar. Para o teor de proteínas, utilizaram-se os valores obtidos para nitrogênio e multiplicou-se pelo fator de conversão 6,25 (Association of Official and Agricultural Chemistry, AOAC, 1970). Para análises de AST foi utilizado o método da antrona (Dische, 1962).

Para a determinação do conteúdo de clorofilas, discos foliares de 100 mg foram macerados em 15 mL de acetona 80% e o volume final do extrato acertado para 40 mL. O extrato foi filtrado em papel-filtro, realizadas as leituras espectrofotométricas de absorvância em 645 e 663 nm e os conteúdos de clorofilas determinados segundo a metodologia de Arnon (1949).

Para a determinação dos teores carotenóides totais foram utilizados 500g de material fresco; a solubilização dos carotenóides foi realizada em hexano, seguindo o método de Higby (1962). A absorvância da leitura espectrofotométrica foi realizada em 450 nm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características estruturais

#### 4.1.1 Características anatômicas

O mutante *hp1* foi o que obteve maior densidade estomática na epiderme da face adaxial, enquanto todos os mutantes em fitocromo apresentaram densidade estomática superior à cultivar Micro-Tom (MT) na epiderme da face abaxial. No entanto, *aurea* e *hp1* foram os mutantes que tiveram os maiores diâmetros equatorial e polar dos estômatos na epiderme adaxial, enquanto que somente o *aurea* obteve os maiores diâmetros polar e equatorial dos estômatos também na epiderme abaxial (Tabela 1).

Embora, no mutante *áurea*, tenha ocorrido o maior tamanho dos estômatos em ambas as faces epidérmicas, associado a uma densidade estomática maior que a cultivar MT, na epiderme abaxial, assim como a maior densidade estomática do mutante *hp1*, na epiderme adaxial, associado aos maiores tamanhos dos estômatos nesta face epidérmica, quando comparado à cultivar MT, não foram observadas diferenças na resistência estomática ( $r_s$ ) e nem na transpiração ( $E$ ) entre os mutantes *hp1* e *aurea*, quando comparados à cultivar MT (Figura 4).

O maior tamanho dos estômatos ocorridos no mutante *aurea* também é uma característica comum às plantas de sombra, pela menor demanda de água em relação às plantas que são completamente expostas a radiação solar e, portanto, não necessitando reduzir o tamanho de seus estômatos e, conseqüentemente, do póro estomático (Nascimento et al., 2005; Lima Junior et al., 2006). Sabe-se que a cultivar MT se desenvolve muito bem em baixas intensidades de radiação, fator que poderia contribuir para alta densidade estomática no mutante MT-*aurea* nas condições de radiação a que foram

submetidas neste trabalho ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). No entanto, é provável que a maior densidade estomática deste mutante, se comparada à cultivar MT, esteja relacionada a um mecanismo de compensação que favoreça o processo fotossintético, visto que suas taxas de fotossíntese potencial (Figura 4) são similares às da cultivar MT, embora o seu conteúdo de clorofila seja menor (Figura 5).

**TABELA 1.** Características anatômicas das epidermes nas faces adaxial e abaxial em folhas de microtomateiros selvagens e fitocromo-mutantes, em estágio de floração.

Características avaliadas	Microtomateiros			
	Micro-Tom	<i>aurea</i>	<i>hpl</i>	<i>atroviolacea</i>
Dens. est. ep. adaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	74,61 ab	65,36 bc	78,31 a	59,20 c
Dens. est. ep. abaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	160,31 b	217,68 a	210,24 a	194,86 a
Dens. cel. ep. adaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	754,16 b	891,08 a	622,30 c	465,58 d
Dens. cel. ep. abaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	749,84 a	774,51 a	779,46 a	571,01 b
Índice estomático ep. adaxial	9,10 b	6,87 c	11,14 a	11,14 a
Índice estomático ep. abaxial	17,80 c	22,25 b	21,10 b	25,68 a
Diâm. polar est. ep. adaxial ( $\mu\text{m}$ )	26,71 b	28,69 a	29,25 a	26,11 b
Diâm. eq. est. ep. adaxial ( $\mu\text{m}$ )	19,03 b	20,71 a	20,60 a	17,83 c
Diâm. polar est. ep. abaxial ( $\mu\text{m}$ )	23,70 b	26,58 a	24,18 b	24,07 b
Diâm. eq. est. ep. abaxial ( $\mu\text{m}$ )	17,26 b	18,94 a	17,36 b	17,02 b
Razão DP/DE ep. adaxial	1,41 a	1,36 a	1,40 a	1,43 a
Razão DP/DE ep. abaxial	1,37 a	1,39 a	1,39 a	1,40 a
Dens. tric. ep. adaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	32,25 a	31,00 a	20,91 b	19,50 b
Dens. tric. ep. abaxial ( $\text{n}^\circ/\text{mm}^2$ )	46,50 a	51,04 a	40,37 a	40,25 a

Dens. Est. Ep.: densidade estomática da epiderme; Dens. Cel. Ep.: densidade de células da epiderme; Ep.: epiderme; Diâm. Polar Est. Ep: diâmetro polar dos estômatos da epiderme; Diâm. Eq. Est. Ep: diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme; Razão DP/DE Ep.: razão dos diâmetros polar e equatorial da epiderme; Dens. Tric.: densidade de tricomas não glandulares. Médias seguidas de mesma letra, entre microtomateiros, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

O mutante *hpl* expressou os maiores valores de densidade estomática e de tamanho dos estômatos (Tabela 1) na epiderme adaxial, se comparado aos demais microtomateiros, enquanto o mutante *atv* obteve os menores valores para tamanho dos estômatos e densidade estomática nessa mesma face epidérmica

(Tabela 1). Evidenciam-se, assim, diferenças de respostas entre esses mutantes, os quais superexpressam eventos mediados por fitocromos.

O mutante *hp1* teve um comportamento estomático similar àquele que ocorre em plantas de sol, no que se refere à densidade estomática. No entanto, para que similar resposta pudesse ter sido observada no mutante *atv* possivelmente seria necessária uma maior intensidade de radiação, acima da oferecida nas condições desse trabalho, isso porque tem sido observado que a mutação do *atv* torna a planta mais sensível e supra-responsiva a altas intensidades de radiação para a indução de respostas fisiológicas, como a produção de antocianina, diferentemente do mutante *hp1*, o qual se torna supra-responsivo à radiação tanto em baixa quanto em alta fluência (Kerckhoffs et al., 1997; Huub et al., 1997)

A maior densidade de células epidérmicas na epiderme da face adaxial foi observada no mutante *aurea*, enquanto que as menores densidades ocorreram nos mutantes *hp1* e *atv*. Sugere-se que essa maior densidade de células ocorridas no mutante *aurea* possa agir para minimizar o efeito negativo da deficiência no conteúdo de fitocromos, assim como de clorofilas, para o desencadeamento de processos fotossintéticos. Neste caso, plantas com um maior número de células por área de epiderme poderiam absorver quantidade maior de radiação, uma vez há aumento de superfície específica à absorção de radiação quando há aumento do número de células por área de epiderme.

Os mutantes *atv* e *hp1* obtiveram os maiores índices estomáticos, sendo *hp1* na epiderme adaxial e *atv* na epiderme abaxial (Tabela 1). Aumento nos índices estomáticos é também um evento comum a folhas de sol, se comparadas às de sombra (Nascimento et al., 2005; Lima Junior et al., 2006) e, geralmente, está associado a uma diminuição no tamanho dos estômatos, o que garante o suprimento de CO<sub>2</sub> necessário à fotossíntese sem que haja perda excessiva de água por meio da transpiração. Isso é possível devido à diminuição do poro

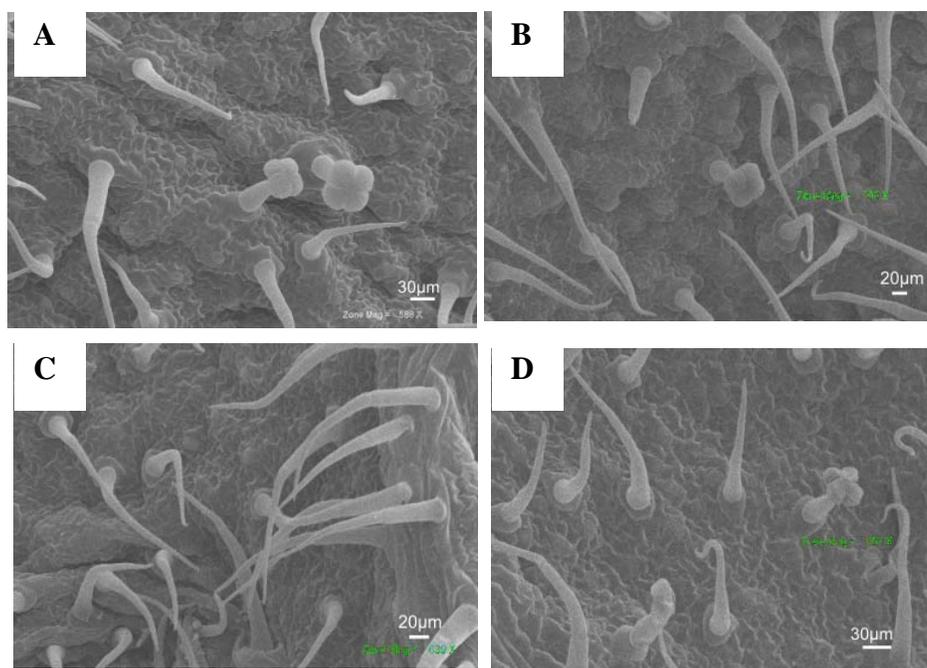
estomático causar maior resistência à saída de água do que a entrada de CO<sub>2</sub> pelo estômato (Bidwell, 1964). Embora tenha havido aumento nos índices estomáticos nos mutantes que superexpressam eventos desencadeados por fitocromo, *hp1* e *atv*, somente o mutante *atv* obteve tamanho reduzido dos estômatos, quanto ao diâmetro equatorial, na epiderme adaxial, se comparado à cultivar MT. No entanto, ambos os diâmetros polar e equatorial das duas faces epidérmicas do mutante *atv* e na face abaxial do mutante *hp1* foram menores que o mutante *aurea*, o qual subexpressa eventos desencadeados pelos fitocromos. Na epiderme abaxial, ambos os mutantes *atv* e *hp1* obtiveram tamanho dos estômatos similar ao da cultivar MT e inferior ao do mutante *aurea*.

A densidade de tricomas não glandulares na epiderme adaxial foi menor nos mutantes que superexpressam fitocromo (Tabela 1). A função dos tricomas não glandulares depende do órgão onde se encontram, de sua densidade e até mesmo do ângulo de inclinação. A alta densidade em folhas pode atuar como uma barreira mecânica à insolação direta nas células ordinárias da epiderme, contribuindo para a redução de temperaturas altas e a perda excessiva de água (Werker, 2000). No entanto, a alta densidade de tricomas pode ampliar a superfície de transpiração (Jonhson, 1975). É possível que a baixa intensidade de radiação e a temperatura controlada nas condições do experimento deste trabalho tenham contribuído para uma menor densidade de tricomas na epiderme da face adaxial nos mutantes *hp1* e *atv*.

Tricomas glandulares de diferentes tipos também ocorreram nos tratamentos estudados. No entanto, não foi realizada análise estatística comparativa da densidade desses tricomas. De acordo com Luckwill (1943), existem quatro tipos de tricomas glandulares que ocorrem em tomateiros. O tipo I é o daqueles com tamanho entre 1,5-2,5 mm e com glândula unicelular na extremidade apical; o tipo IV tem morfologia semelhante à do tipo I, porém, com tamanho entre 0,2-0,4 mm; o tipo VI possui um corpo que se afila da base

para a extremidade apical, encerrando com glândula multicelular composta de 4 lóbulos, e o comprimento variando entre 0,2-0,4 mm e no tipo VII, o qual tem glândula multicelular com 4 lóbulos na extremidade, mais evidente que a do tipo VI, e seu corpo se mantém com diâmetro uniforme da base à extremidade apical, o comprimento varia entre 0,05-0,1 mm (Luckwill, 1943)

Neste trabalho, observou-se a presença de tricomas glandulares do tipo IV em ambas as faces epidérmicas de todos os tratamentos estudados; do tipo VI na epiderme da face abaxial de todos os microtomateiros e face adaxial do mutante *atv*; do tipo VII na epiderme abaxial dos microtomateiros ‘MT’ e *hpl* e na face adaxial do mutante *aurea*. Tricomas glandulares do tipo I não foram observados para os microtomateiros deste trabalho. A função de destaque dos tricomas glandulares no cultivo de tomateiro é a resistência química que apresentam a alguns ácaros pela produção de exsudados tóxicos contidos nas suas extremidades (Gonçalves et al., 2006). Uma vez que houve mudanças na ocorrência dos diferentes tipos de tricomas glandulares entre os diferentes microtomateiros estudados neste trabalho, acredita-se que os fitocromos possam estar envolvidos nos processos de formação dessas estruturas que conferem maior ou menor resistência química às plantas. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados e dirigidos para esta questão específica. Detalhes dos tricomas glandulares podem ser observados na Figura 1.



**FIGURA 1.** Eletromicrografias de varredura da epiderme abaxial de microtomateiros cv. Micro-Tom (A), *aurea* (B), *hp1* (C) e *atroviolacea* (D), em estágio de floração, evidenciando a presença de tricomas glandulares e deposição de cera.

A espessura da epiderme em plantas é uma característica altamente plástica e tem se mostrado responsiva a diferentes situações ambientais às quais as plantas são submetidas. Neste trabalho, observou-se que os mutantes *hp1* e *atv* obtiveram maior espessura da epiderme adaxial, se comparados à cultivar MT (Tabela 2). Esse comportamento ocorre com frequência em folhas de sol, se comparadas às de sombra, e a ocorrência nos mutantes que superexpressam fitocromo neste trabalho, diferentemente dos demais microtomateiros, indica que há participação dos fitocromos nesse processo. Na epiderme abaxial, somente o mutante *atv* obteve maior espessura se comparado aos demais microtomateiros (Tabela 2). Essa maior diferença na espessura da epiderme na face adaxial, como

observado no mutante *hp1*, se comparada à epiderme na face abaxial, é esperada, uma vez que é a face epidérmica mais exposta ao recebimento de radiação solar direta. De modo similar aos resultados obtidos neste trabalho para espessura de epiderme dos mutantes que superexpressam fitocromo, outros trabalhos reportam quanto às condições de maior disponibilidade de radiação (Nakazono et al., 2001; Nascimento et al., 2005; Castro et al., 2005; Lima Junior et al., 2006).

O mutante *hp1* também obteve a maior espessura do parênquima paliçádico e esponjoso em relação a todos os demais microtomateiros (Tabela 2), o que também é uma característica marcante de folhas de sol quando comparadas às folhas de sombra (Hoflacher & Bauer, 1982; Terashima et al., 2001). Esses parênquimas apresentam grande capacidade de respostas aos estímulos de radiação luminosa, influenciando a espessura do limbo foliar. O aumento na espessura ocorre em função de modificações no padrão de expansão de células do mesofilo, alongando-se, ou do aumento no número de camada de células do parênquima paliçádico (Kim et al., 2005; Terashima et al., 2001), contribuindo, assim, para o direcionamento e a absorção mais uniforme da radiação pelos tecidos do mesofilo. Não foram observadas variações no número de camadas de células entre os diferentes tratamentos estudados neste trabalho, indicando que o aumento na espessura dos parênquimas ocorreu em função do processo de alongamento celular.

O mutante *atv* obteve espessura de parênquima paliçádico similar e parênquima esponjoso menos espesso, quando comparado à cultivar MT (Tabela 2). A diferença no padrão de resposta entre os dois mutantes que superexpressam fitocromo provavelmente está no fato de o mutante *atv* requerer maior intensidade de radiação para o desencadeamento de algumas respostas fisiológicas inerentes à sua mutação (Kerckhoffs et al., 1997; Huub et al., 1997), condição esta não contemplada nas condições experimentais deste trabalho.

Para espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, o mutante *aurea* obteve os menores valores para esse parâmetro (Tabela 2), portanto, confirmando a influência dos fitocromos sobre a espessura dos tecidos do mesofilo, visto que esse mutante tem deficiência no conteúdo desses fotorreceptores. A diminuição da espessura dos tecidos do mesofilo também é uma característica de plantas de sombra.

**TABELA 2.** Espessura de tecidos do limbo foliar de microtomateiros selvagens e fitocromo-mutantes, em estágio de floração.

Microtomateiros	Espessura de tecidos ( $\mu\text{m}$ )			
	Epiderme adaxial	Parênquima paliçádico ( $\mu\text{m}$ )	Parênquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ )	Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )
Micro-Tom	22,70 b	90,61 b	105,00 b	17,85 b
<i>aurea</i>	22,25 b	67,22 c	91,87 c	17,37 b
<i>hp1</i>	27,30 a	110,12 a	118,50 a	17,82 b
<i>atroviolacea</i>	27,22 a	96,27 b	92,37 c	20,00 a

Médias seguidas de mesma letra, entre microtomateiros, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ )

A dificuldade de estudos sobre eventos ligados à fotomorfogênese tem sido bastante relatada, principalmente em função da interação entre os diferentes fotorreceptores de radiação nos espectros do azul/UV-A, fototropinas e criptocromos, e radiação V/VD, os fitocromos. Já se sabe da interação desses fotorreceptores com outros ainda não caracterizados, como aqueles para o espectro do UV-B (Bringgs & Olney, 2001; Chen et al., 2004).

Raras são as pesquisas que relatam o efeito direto da ação de fitocromos sobre a morfologia foliar. No entanto, Kozuka et al. (2005) relatam que o controle da fotomorfogênese foliar é predominantemente determinado pelo *phyB* e criptocromos, quanto a respostas à radiação V/VD e azul, respectivamente.

Embora não tenham sido usados mutantes isolados para cada tipo de fitocromo neste trabalho, pode-se considerar o mutante *aurea* como deficiente em *phyB*, para fins de comparação. Isso porque sua mutação está na deficiência

de síntese de cromóforo, tornando-o deficiente para todos os tipos de fitocromo, uma vez que o cromóforo é comum a todos os tipos (Terry & Kendrick, 1996). No mesmo sentido, podem-se considerar os mutantes *atv* e *hp1* superresponsivos para eventos desencadeados pelo *phyB*, uma vez que suas mutações não são isoladas para fitocromos específicos (Kendrick et al., 1997).

Assim como ocorrido para *hp1* neste trabalho (Tabela 1), *Dara-5*, um tomateiro mutante que superexpressa *phyB*, apresentou aumento de 28% na densidade estomática em relação ao selvagem (Schittenhelm et al., 2004). No entanto, não foram observadas diferenças na largura e no comprimento dos estômatos.

Apesar de Nagatani et al. (1993) não terem encontrado efeito do *phyA* sobre mudanças na morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana*, Smith (1995) propõe que *phyA* e *phyB* podem, predominantemente, controlar o alongamento polar de células, se comparados aos demais tipos de fitocromos, os quais podem ser responsáveis pelo alargamento não-direcional das células. Tsukaya et al. (2002) sugerem que a mutação em *phyB* afeta não somente o alargamento celular, mas também o número de células na lâmina foliar. Estes autores, trabalhando com folhas de *Arabidopsis thaliana* mutante em *phyB*, consideraram essa mutação responsável pela diminuição no tamanho e no número de células dos tecidos do mesofilo, resultando em folhas menos espessas que aquelas das plantas controle.

Resultado compatível foi observado neste trabalho para o mutante *aurea*, o qual obteve uma redução de 26% na espessura do parênquima paliçádico e 12,5% na espessura do parênquima esponjoso, em relação à cultivar MT (Tabela 2). Considerando-se a análise em secção transversal foliar, essa redução pode ser atribuída a mudanças no comprimento das células, visto que não foi detectado aumento no número de camadas dos parênquimas que compõem o mesofilo. O decréscimo na espessura da lâmina foliar, associado à

diminuição no número de células, sugere que o desenvolvimento das folhas de plantas *phyB* mutantes cessa antes que o de folhas de plantas selvagens (Tsukaya et al. 2002).

#### **4.1.2 Características ultra-estruturais**

Observou-se que mutante *atv*, visivelmente, tem ondulações no plano topográfico de deposição de cera mais suaves que as ondulações que ocorrem nos demais microtomateiros e, portanto, tendo uma arquitetura de deposição mais plana (Figura 1). A atuação específica de fitocromos influenciando nos padrões de deposição de cera ainda não é conhecida, no entanto, as observações deste trabalho evidenciam uma diferença no padrão topográfico de deposição de cera na epiderme abaxial dos microtomateiros estudados.

Qualidade espectral ou intensidade de radiação podem causar diferenças no padrão de deposição de cera epicuticular, assim como na sua quantidade e composição química (Nagarajah, 1979; Hauke & Schreiber, 1998).

Tanto a presença quanto a arquitetura da deposição de cera epicuticular influenciam na coloração foliar, assim como na sua performance fotossintética, em função das diferenças nos padrões de reflexão, tanto quantitativamente quanto dos diferentes espectros da radiação. Clark & Lister (1975) observaram, em diferentes espécies arbóreas, que os padrões de deposição de cera são correlacionados com o grau de reflexão dos espectros do azul e do ultravioleta. Os mesmos autores relatam que os diferentes padrões de deposição de cera podem ocorrer como um processo adaptativo às condições de radiação UV do ambiente, refletindo-a aos níveis fisiologicamente tolerantes às plantas e também auxiliando na proteção das plantas a altas temperaturas, pela reflexão dos espectros visíveis da radiação. Nesse sentido pode-se inferir que mutações em

fitocromos podem induzir modificações na deposição das ceras epicuticulares pela alteração na recepção ou transdução de sinais dos espectros V e VD. No entanto, são necessários estudos mais específicos para a comprovação desse efeito.

Com exceção da cultivar MT, as áreas dos cloroplastos dos demais microtomaterios tiveram redução de tamanho no parênquima lacunoso, quando comparado ao paliçádico, além da redução do número de cloroplasto por célula no parênquima lacunoso, em todos os microtomateiros estudados (Tabela 3).

O comprimento dos cloroplastos no mutante *hp1* foi maior que nos demais microtomateiros no parênquima paliçádico, enquanto que a maior largura ocorreu em plantas da cultivar MT no parênquima lacunoso (Tabela 3).

No parênquima lacunoso dos mutantes *hp1* e *atv* houve uma diminuição na área individual dos cloroplastos em relação aos tratamentos MT e *aurea*, mas, concomitantemente, houve um aumento no número de cloroplastos por célula (Tabela 3).

Tanto no parênquima paliçádico quanto no parênquima lacunoso, a área de amido por cloroplasto foi maior nos mutantes *hp1* e *atv* (Tabela 3).

Além da diferença no número e no tamanho de cloroplastos presentes nas células do parênquima paliçádico e lacunoso, como observado neste trabalho, diferenças nas características estruturais também têm sido encontradas nesses cloroplastos. Terashima et al. (1986) observaram que os cloroplastos presentes no parênquima paliçádico apresentam características de cloroplastos de sol, com menor número de tilacóides por granum. Na mesma folha, aqueles presentes no parênquima lacunoso já apresentam características de cloroplastos de sombra, com granum mais espesso e com maior número de tilacóides por granum.

**TABELA 3.** Características dos cloroplastos de microtomateiros selvagens e fitocromo-mutantes, no estágio de floração, nos parênquimas paliçádico e lacunoso.

Características avaliadas	Microtomateiros			
	Micro-Tom	<i>aurea</i>	<i>hpl</i>	<i>atroviolacea</i>
Parênquima paliçádico				
Comprimento cloroplastos ( $\mu\text{m}$ )	5,71b	6,52 ab	7,53 a	5,83 b
Largura cloroplastos ( $\mu\text{m}$ )	2,36 a	3,68 a	2,64 a	2,39 a
Área cloroplastos ( $\mu\text{m}^2$ )	10,63 a	14,08 a	14,00 a	10,68 a
Nº cloroplasto/célula	17,6 c	22,10 b	18,50 bc	26,60 a
Área amido/cloroplasto ( $\mu\text{m}^2$ )	1,06 b	0,7 b	4,87 a	4,06 a
Nº amido/cloroplasto	1,8 a	1,7 a	1,6 a	1,4 a
Parênquima lacunoso				
Comprimento cloroplastos ( $\mu\text{m}$ )	5,04 a	5,57 a	5,53 a	5,56 a
Largura cloroplastos ( $\mu\text{m}$ )	3,47 a	2,45 b	2,17 b	2,10 b
Área cloroplastos ( $\mu\text{m}^2$ )	13,8 a	10,73 ab	8,56 b	8,54 b
Nº cloroplasto/célula	6,3 bc	5,3 c	8,4 a	7,3 ab
Área amido/cloroplasto ( $\mu\text{m}^2$ )	1,58 ab	0,76 b	1,8 a	2,40 a
Nº amido/cloroplasto	1,8 a	0,9 a	1,4 a	1,3 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A largura e o comprimento dos cloroplastos, além do seu número por célula, são influenciados pelos fitocromos. Kasperbauer & Hamilton (1984) observaram que o comprimento dos cloroplastos de tabaco, após a exposição da planta à radiação VD, era maior que o comprimento dos cloroplastos nas plantas expostas à radiação no espectro do V, sendo o oposto observado para a largura. Os mesmos autores também relatam que o número de cloroplastos é reduzido

após a exposição das plantas à radiação VD. O presente trabalho corrobora com a pesquisa supracitada, no sentido de que o tamanho e, principalmente, o número dos cloroplastos são influenciados pelos fitocromos, em detrimento das diferenças encontradas nessas características para os diferentes microtomateiros fitocromo-mutantes estudados.

Assim como se observou aumento no número de cloroplastos no mutante *hp1* em relação à cultivar MT nesse trabalho, Liu et al. (2004) observaram um aumento de 30% no número de cloroplastos do mutante de tomateiro *hp1* em relação ao selvagem. No entanto, a maior expressão no aumento do número de cloroplastos por célula em relação ao selvagem neste trabalho ocorreu para o mutante *atv*, tendo atingido um aumento de mais de 50% no número de cloroplastos por célula no parênquima paliçádico em relação ao selvagem 'MT'. Sugere-se que esse maior número de cloroplastos por células do parênquima paliçádico no mutante *atv*, em relação aos demais microtomateiros (Tabela 3), tenha contribuído para o mais alto teor de clorofilas desse mutante em relação aos demais microtomateiros (Figura 5).

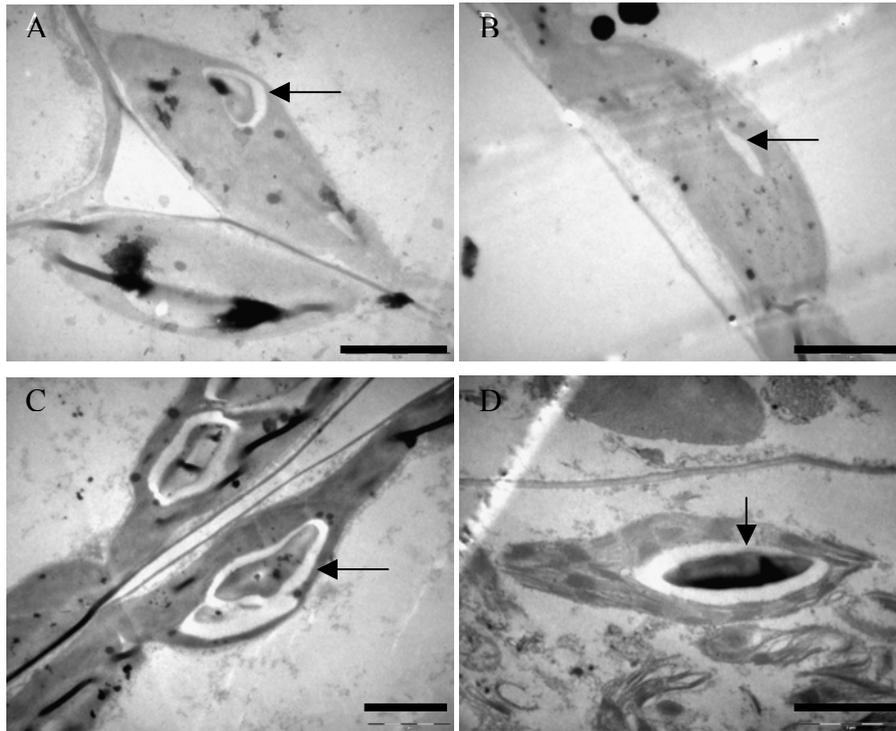
Reed et al. (1993) sugerem que a baixa concentração de clorofila encontrada em *Arabidopsis* deficiente em *phyB* tenha ocorrido parcialmente em função do decréscimo do número de cloroplastos por células neste mutante. O número de cloroplastos por célula no mutante *aurea*, encontrado neste trabalho, se comparado ao dos demais microtomateiros (Tabela 3) e o mais baixo teor de clorofilas encontrado também nesse mutante (Figura 5) não sugerem que a densidade de cloroplasto celular tenha interferido no teor de clorofilas. Portanto, sugere-se que a baixa concentração de clorofila neste mutante tenha ocorrido devido a um baixo teor de pigmento por cloroplasto.

O maior acúmulo de carboidratos no mutante *hp1*, o qual obteve os maiores valores de  $A_{pot}$ , possivelmente ocorreu na forma de amido (Tabela 3), uma vez que o investimento em açúcares solúveis por esse mutante foi inferior

ao do mutante 'MT' (Figura 6). No entanto, o mutante *atv* teve aumento de área de amido por cloroplasto em relação à cultivar selvagem (Tabela 3) e manteve o mesmo nível de açúcares solúveis que a cultivar MT (Figura 6). O mutante *aurea* teve a menor área total de amido por cloroplasto, dentre os demais microtomateiros, tanto no parênquima paliádico quanto no lacunoso (Tabela 3), apesar de sua  $A_{pot}$  ser equiparada à cultivar MT (Figura 4).

Assim como observado para os cloroplastos, Kasperbauer & Hamilton (1984) observaram, por meio de submissões de plantas de fumo à radiação V e VD, que o tamanho dos grãos de amido é influenciado pelos fitocromos. O presente trabalho corrobora essas observações por meio das análises de diferentes mutações em microtomateiros. Na Figura 2, observam-se eletromicrografias representativas da presença de amido nos cloroplastos dos diferentes tratamentos estudados.

O movimento dos cloroplastos na célula é um evento dependente predominantemente do espectro de radiação na faixa do azul e as fototropinas são os fotorreceptores que induzem o citoesqueleto, os microfilamentos e os microtúbulos a atuarem na movimentação dos cloroplastos (Kasahara et al., 2004). No entanto, tem-se observado que os fitocromos também podem atuar no movimento dos cloroplastos em plantas crescidas somente sob radiação no espectro do vermelho (Kadota et al., 2000) ou, ainda, segundo Kasahara et al. (2004), modular o movimento dos cloroplastos em condições de luz branca, por meio da interação com as fototropinas. Kasahara et al. (2004) apresentam um modelo para o movimento dos cloroplastos, no qual o movimento induzido pelo espectro do vermelho ocorre em função da atuação somente dos microtúbulos.

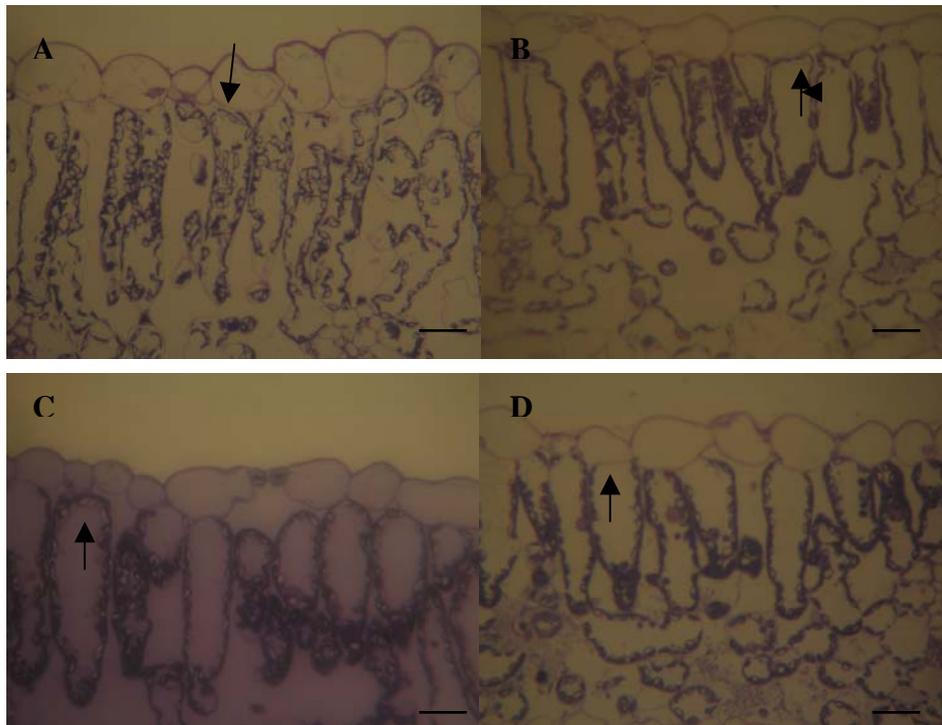


**FIGURA 2.** Eletromicrografia de transmissão de cloroplastos presentes em células do parênquima paliçádico em microtomateiros cultivar MT (A), *aurea* (B), *hp1* (C) e *atroviolacea* (D), em estágio de floração. As setas indicam a presença de grãos de amido nos cloroplastos. As barras representam 2  $\mu\text{m}$ .

Neste trabalho, observou-se que os cloroplastos estavam posicionados ao longo das adjacências da parede celular das células do mesofilo nos microtomateiros estudados, com exceção do mutante *atv*, no qual havia ausência de cloroplastos nas adjacências da parede periclinal externa da maioria das células do parênquima paliçádico (Figura 3). Este é o parênquima clorofiliano mais exposto à radiação solar direta e essa ausência de cloroplastos posicionados

próximo à parede celular periclinal externa sugere uma evitação às condições de radiação incidente, apesar da disponibilidade de radiação ser baixa nas condições desse experimento ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

O movimento dos cloroplastos evitando a radiação direta ocorre como um processo de fotoproteção contra processos fotooxidativos e para dar suporte à manutenção, especialmente do fotossistema II (Park et al., 1996). Neste trabalho, a observação deste evento foi predominantemente sobre o mutante em fitocromo *atv*, o qual detém a maior densidade de cloroplastos por célula no parênquima paliádico (Tabela 3), assim como o maior teor de clorofilas totais (Figura 5). Tem-se observado que o movimento dos cloroplastos não ocorre em plantas mutantes em fototropinas (Kasahara et al., 2004) e, portanto, apesar de diferenças nesse processo terem ocorrido neste trabalho em função da mutação em fitocromo, possivelmente a participação desse fotorreceptor contribuiu como forma modulativa à ação das fototropinas.



**FIGURA 3.** Fotomicrografia de secções transversais foliares dos microtomateiros cultivar Micro-Tom (A) e os mutantes *aurea* (B), *hp1* (C) e *atroviolacea* (D), em estágio de floração. As setas indicam a presença ou ausência de cloroplastos adjacentes à parede celular periclinal externa em células do parênquima paliádico. As barras representam 20 $\mu$ m.

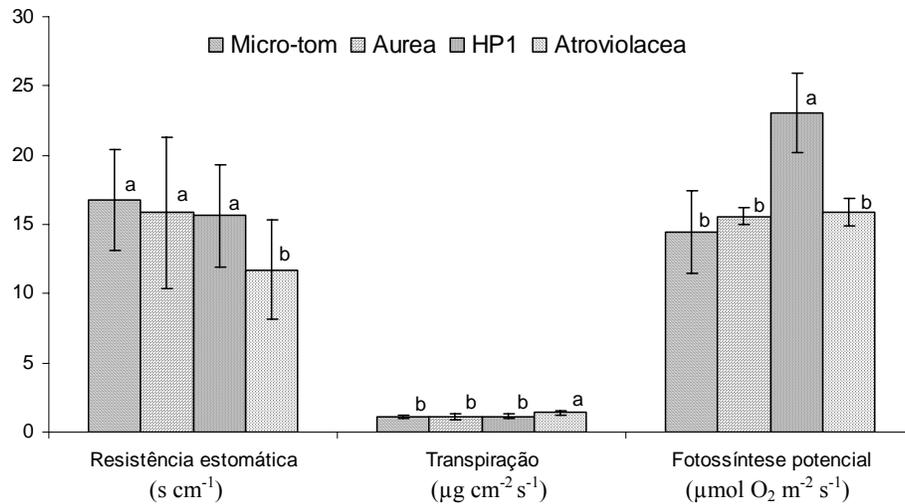
## 4.2 Características fisiológicas

### 4.2.1 Características biofísicas

O mutante *atv* foi o que obteve a menor resistência estomática ( $r_e$ ), assim como uma maior transpiração ( $E$ ) (Figura 4), parâmetros estes similares entre os demais microtomateiros. A fotossíntese potencial ( $A_{pot}$ ) foi maior no mutante *hp1* em relação aos demais microtomateiros (Figura 4).

O mutante *aurea*, embora deficiente em todos os tipos de fitocromo, obteve valores de  $A_{pot}$  estatisticamente similares aos da cultivar MT (Figura 4). A similaridade das taxas fotossintéticas do mutante *aurea* em relação à cultivar selvagem, mesmo com menores teores de clorofilas a e b (Figura 5), provavelmente está associada a uma maior síntese de proteínas que compõem o aparato fotossintético. Observou-se, neste trabalho, que tanto os teores de proteínas solúveis totais quanto de nitrogênio total foram maiores no mutante *aurea*, se comparados aos dos demais microtomateiros (Figura 6). Sabe-se que a rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase), enzima-chave no aparato fotossintético de plantas C3, representa, aproximadamente, 20% do total de nitrogênio foliar em plantas de sol com boa disponibilidade de nutrientes (Evans & Seemann, 1984).

Assim como neste trabalho, outros autores relatam a alta capacidade fotossintética do mutante *aurea* em relação às plantas selvagens, mesmo tendo menor conteúdo de clorofilas (López-Juez et al., 1990; Becker et al., 1992).



**FIGURA 4.** Trocas gasosas em microtomateiros selvagem e fitocromomutantes, em estágio de floração. Colunas com letras iguais, dentro de um mesmo parâmetro de avaliação, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Embora o mutante *atv* detenha um alto potencial de expressar eventos mediados por fitocromos, além de seu maior índice estomático (Tabela 1), sua menor resistência estomática (Figura 4) e de seus maiores teores de clorofilas a e b, se comparado aos demais microtomateiros (Figura 5), este mutante não alcançou o potencial fotossintético observado no mutante *hp1*. Não é esperado que esse menor desempenho do mutante *atv* tenha ocorrido somente devido à sua baixa densidade estomática na epiderme adaxial (Tabela 1), mas que, provavelmente, esteja ligado ao requerimento de altas intensidades de radiação, como observado para o desencadeamento da biossíntese de antocianina (Kerckhoffs et al., 1997), condição esta de radiação não ofertada nas condições experimentais deste trabalho. No entanto, o mutante *hp1* obteve alta performance fotossintética, mesmo em condições de baixa intensidade de

radiação (Figura 4), condição na qual este mutante foi também super-responsivo à biossíntese de antocianina (Kerckhoffs et al., 1997).

A concentração de proteínas e nitrogênio do mutante *hp1* foi maior que os níveis da cultivar MT (Figura 6). Sabe-se que a mutação *hp1* causa aumento na síntese de algumas enzimas, incluindo a rubisco, favorecendo, assim, a fotossíntese, parâmetro este que atingiu as maiores taxas potenciais nesse mutante (Figura 4). Peters et al. (1998) relatam que as proteínas de ligação à clorofila (CAB), rubisco e chalcona sintase são reguladas positivamente com a mutação *hp1* em tomateiro tendo, portanto, maior expressão nesse mutante que em plantas selvagens.

#### **4.2.2 Características bioquímicas**

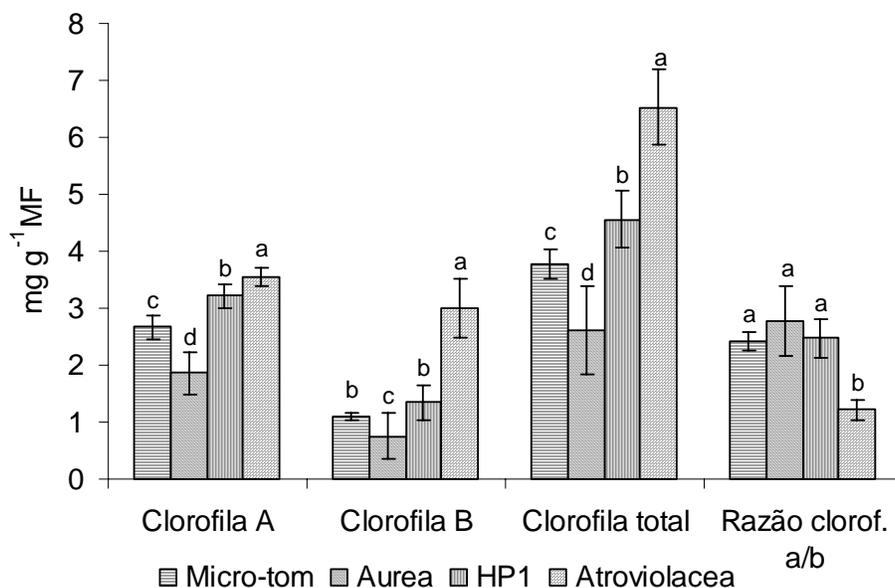
Observou-se, neste trabalho, forte influência de fitocromos sobre a produção de clorofilas. O mutante *atv* teve o maior conteúdo de clorofilas a, b e total, no entanto a menor razão clorofila a/b, comparando-se todos os demais microtomateiros, enquanto que o mutante *aurea* obteve os menores conteúdos de clorofilas a, b e total (Figura 5).

Assim como observado para o conteúdo de clorofilas a e b, assim como para a razão clorofila a/b no mutante *atv*, muitos autores relatam um aumento no conteúdo de clorofilas à medida que aumenta o nível de sombra, assim como a diminuição da razão clorofila a/b (Buisson & Lee, 1993; Nakazono et al., 2001; Lima Junior et al., 2006). Consideram-se os processos fotooxidativos como responsáveis pela diminuição no conteúdo de clorofilas em plantas expostas a altas intensidades de radiação (Kramer & Koslowski, 1979). A diminuição na razão clorofila a/b, à medida que diminui a intensidade de radiação, é discutida como ocorrendo em função do enriquecimento do espectro VD nas condições de sombra, provocando, assim, um aumento das reações do fotossistema II, o qual é

mais rico em clorofila b que em clorofila a (Anderson, 1986) e, provavelmente, atua como um sistema de aclimatização de plantas em ambientes enriquecidos com o espectro VD (Chow et al., 1990). Essa aclimatização tem o sentido de maximizar a absorção de radiação em condições de sombreamento.

Uma das características fenotípicas dos mutantes *atv* e *hp1* é um maior conteúdo de pigmentos, o que confere uma coloração verde intensa pelo maior acúmulo de clorofilas nas plantas, se comparadas às plantas selvagens (Kendrick et al., 1997). No entanto, observou-se que o mutante *atv* teve um comportamento distinto do mutante *hp1* quanto ao seu conteúdo de clorofilas a, b e total, assim como na razão de clorofila a/b (Figura 5). Possivelmente, esse comportamento sofreu influência da alta densidade de cloroplastos por célula no parênquima paliádico (Tabela 3), assim como do posicionamento dos cloroplastos, evitando a radiação direta em células do parênquima paliádico (Figura 3) e da baixa intensidade de radiação das condições do experimento, não favorecendo processos fotooxidativos.

A coloração amarelo-ouro do mutante *aurea* foi a causa de sua denominação e essa coloração é atribuída à sua deficiência em clorofila. Terry & Kendrick (1999) relatam que esse mutante tem reduzidos níveis de protoclorofilídeo, devido a uma inibição na sua síntese. No entanto, a via biossintética do protoclorofilídeo a partir do ácido 5-aminolevulónico (ALA) é intacta, o que sugere que sua deficiência ocorra em função de inibição na síntese do ALA.



**FIGURA 5.** Teor de clorofilas a, b, total e relação clorofila a/b em microtomateiros selvagem e fitocromo-mutantes, em estágio de floração. Colunas com a mesma letra, dentro de um mesmo parâmetro de avaliação, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Segundo Koornneef et al. (1985) e López-Juez et al. (1990), o nível de clorofila do mutante *aurea* está entre 33% a 61% daquele apresentado pela cultivar selvagem, a depender das condições de radiação e temperatura. Os resultados encontrados para clorofilas totais nas condições experimentais desse trabalho para o mutante *aurea* foram 30,6% menores que a cultivar MT, um pouco menor que o percentual médio encontrado por outras pesquisas, mas reafirmando as características desse mutante para o conteúdo de clorofilas.

Smith (1982) propõe que plantas com deficiência em *phyB* apresentem características de plantas de sombra, uma vez que elas recebem um balanço de radiação rico em VD se comparadas às plantas a pleno sol (Smith, 1982). No

entanto, não foram observadas diferenças no mutante *aurea* quanto à razão clorofila a/b, em relação à cultivar selvagem, que fossem condizentes com o comportamento de plantas de sombra (Figura 5). No entanto, foi observado que, em plantas de *Arabidopsis* deficiente em *phyB*, havia aumento na razão clorofila a/b à medida em que havia aumento na intensidade de radiação (Walters et al., 1999).

O baixo conteúdo de clorofilas do mutante *aurea* corrobora com outras pesquisas que estudam a ação do *phyB* sobre a biossíntese desse pigmento. Em *Arabidopsis*, Reed et al. (1993) observaram que plantas mutantes em *phyB* acumularam menos clorofila que plantas selvagens. Schittenhelm et al. (2004), estudando o mutante Dara-5 de tomateiro, o qual superexpressa *phyB*, observaram que, no período de florescimento das plantas, o conteúdo de clorofila desse mutante era similar ao de plantas selvagens. No entanto, a concentração da clorofila decresceu quase que linearmente após 33 dias de emergência nas plantas do tipo selvagem, enquanto que, nas plantas mutantes, o conteúdo de clorofila se manteve estável até o período de 72 dias após emergência.

A atuação de fitocromos sobre a biossíntese de clorofilas já é bastante conhecida e a saturação dessa resposta ocorre com apenas aproximadamente 20% dos fitocromos na forma ativa (F<sub>ve</sub>) (Oelze-Karow & Mohr, 1982). Wehmeyer et al. (1990) relataram, em estudos com plantas de tomate e fumo, que os fitocromos também controlam a expressão de genes que codificam proteínas que se ligam às clorofilas a e b, as quais compõem o fotossistema I e fotossistema II.

Ken-Dror & Horwitz (1990) relatam que tomateiros mutantes *aurea* só têm reversibilidade de fitocromo em luz V de baixa fluência e que o efeito do V é completamente revertido pelo VD. Mesmo que as plantas estejam sob luz branca, o mutante *aurea* é deficiente na abundância e na regulação de proteínas

que se ligam à clorofila e na síntese do pigmento. Estes autores também relatam que o enverdecimento das plantas mutantes *aurea* após pulsos de luz V, a partir do escuro, é mais lento que nas plantas selvagens.

Embora o mutante *aurea* tenha expressado o menor conteúdo de clorofilas dentre os demais microtomateiros foi o mutante que obteve o maior conteúdo de nitrogênio total, se comparado a todos os demais microtomaterios estudados (Figura 6). Sendo assim, a alocação desse nitrogênio estaria direcionada a outros compostos que não a clorofila, devido ao seu baixo conteúdo e, portanto, acredita-se que este esteja alocado em proteínas, visto que esse mutante também obteve o maior conteúdo de proteínas totais dentre todos os demais microtomateiros estudados (Figura 6). A alocação de nitrogênio em proteínas talvez seja o fator de maior contribuição para a alta performance fotossintética do mutante *aurea*, em detrimento de seu baixo conteúdo de clorofilas, observado neste trabalho.

A relação fotossíntese e nitrogênio tem sido bastante discutida na literatura. A capacidade fotossintética de uma planta, geralmente, é proporcional ao conteúdo de nitrogênio (Bolton & Brown, 1980). Isso ocorre devido à alocação de nitrogênio em proteínas-chaves no processo fotossintético, como a rubisco, a qual concentra uma proporção média de 20% do total de nitrogênio foliar em plantas C3 e em boas condições de nutrição (Evans & Seeman, 1984). Essa relação tem sido comprovada para diferentes espécies e em diferentes situações ambientais de radiação (Bolton & Brown, 1980; Seeman et al., 1987)

Apesar do maior conteúdo de clorofilas do mutante *atv* (Figura 5), este teve o menor conteúdo de nitrogênio e proteínas (Figura 6). Porém, esse menor conteúdo protéico não afetou as taxas fotossintéticas, comparativamente à cultivar MT (Figura 4). No mutante que superexpressa *phyB*, *Dara-5*, observou-se similar capacidade na assimilação de nitrogênio entre o mutante e a cultivar

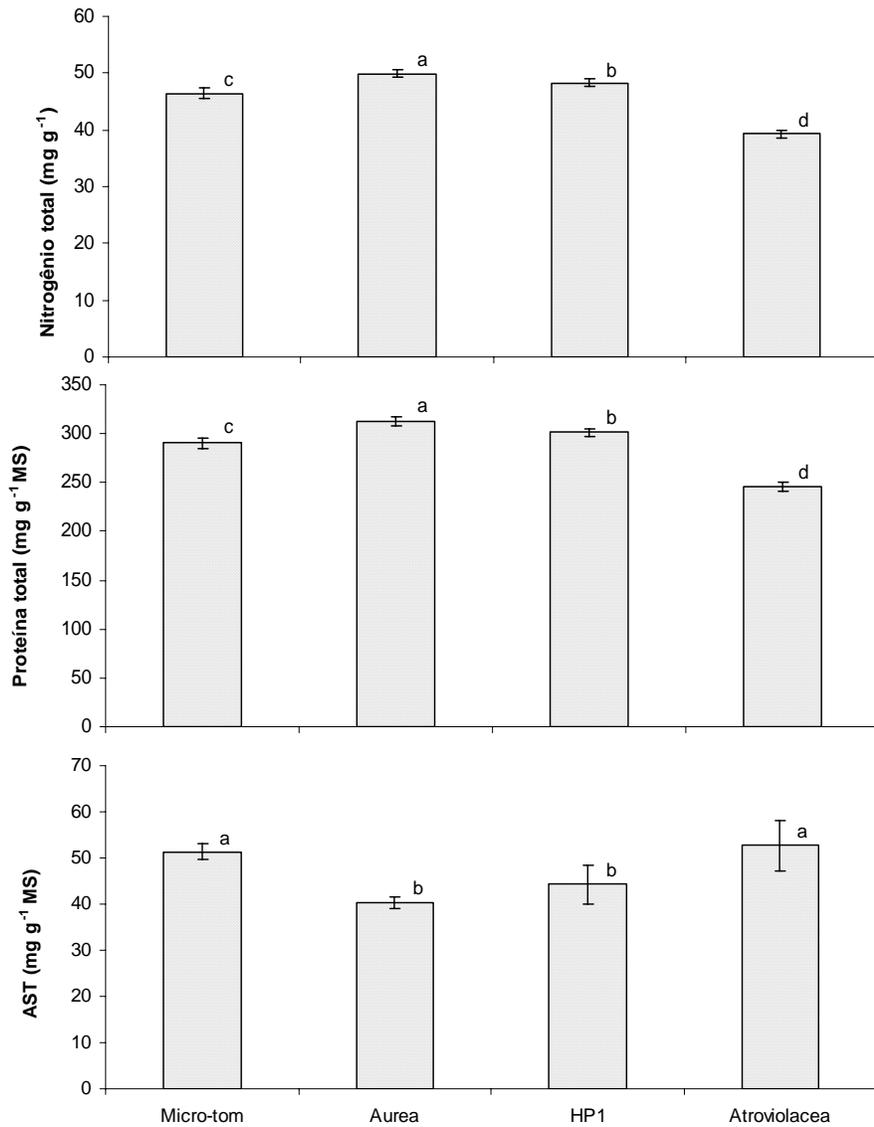
selvagem, porém, o particionamento foi bastante diferenciado entre os órgãos das plantas (Schittenhelm et al., 2004).

O conteúdo de açúcares solúveis do mutante *atv* foi similar ao da cultivar MT, enquanto que o mutante *hp1* teve o conteúdo desses açúcares menor que a cultivar MT (Figura 6). É relatado que o aumento de açúcares solúveis ocorre em resposta à produção de fotossimilados e, conseqüentemente, em plantas com maiores taxas fotossintéticas (Rizzini, 1976). Porém, mesmo o mutante *hp1*, o qual obteve as maiores taxas de  $A_{pot}$ , teve o conteúdo de AST menor que a cultivar MT. Observou-se também que a concentração de AST no mutante *aurea* foi inferior à da cultivar MT (Figura 6), apesar de serem similares quanto à  $A_{pot}$ .

Para o tomateiro *Dara-5*, mutante que superexpressa *phyB*, Schittenhelm et al. (2004) observaram que os mutantes cultivados em casa de vegetação tinham menor conteúdo de AST, quando comparados às plantas selvagens, assim como observado neste trabalho para *hp1*. Já Yen et al. (1997) observaram maior concentração de carboidratos em tomates mutantes *hp1* em relação às plantas selvagens e atribuíram essa maior concentração ao maior conteúdo de clorofilas desse mutante. Esta relação também pode ser observada neste trabalho, em que maior concentração de AST ocorreu no mutante *atv*, o qual expressou o maior conteúdo de clorofilas dentre os demais microtomateiros, embora a maior capacidade fotossintética tenha sido observada para o mutante *hp1*. No entanto, não foram observadas diferenças no conteúdo de AST entre os microtomateiros *atv* e 'MT'.

Algumas pesquisas apontam a participação dos fitocromos na concentração de açúcares solúveis. A exposição de plantas de melancia à baixa intensidade de radiação VD causou aumento no conteúdo de açúcares solúveis em lâminas foliares e pecíolos, indicando efeito positivo de *phyA* nesse processo

(Ranwala et al., 2002), resposta esta também observada por Dijkwel et al. (1997) para *Arabidopsis*.



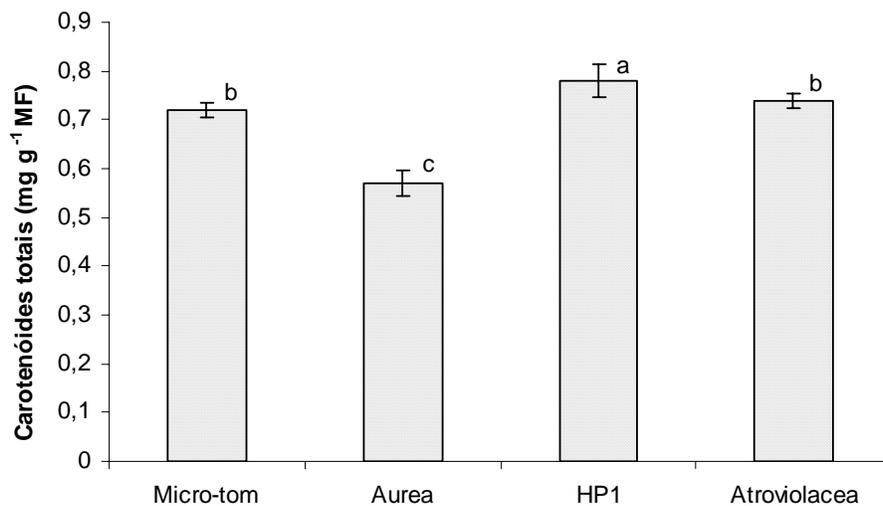
**FIGURA 6.** Concentração de nitrogênio total, proteínas totais e açúcares solúveis totais (AST) em microtomateiros selvagens e fitocromo-mutantes, em estágio de floração. Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os carotenóides são pigmentos encontrados nos tilacóides das plantas e desempenham funções importantes na biologia vegetal, como absorção de radiação luminosa, ação antioxidativa e coloração de flores e frutos. Thomas & Jen (1975) comprovaram que a regulação da biossíntese de carotenóides é regulada pelos fitocromos.

Assim como para o conteúdo de clorofilas, o mutante *aurea* teve o menor conteúdo de carotenóides totais neste trabalho (Figura 7). No entanto, deve-se atentar para o fato de que, embora o mutante *atv* tenha sido o microtomateiro que obteve o maior conteúdo de clorofilas, não foi o que obteve o maior conteúdo de carotenóides. Isso indica uma relação não paralela entre o conteúdo desses dois pigmentos para este mutante (Figuras 5 e 7), da mesma forma como também não se observou, nesse mutante, um comportamento paralelo entre o conteúdo de carotenóides e a densidade de cloroplastos (Tabela 3). Sendo os carotenóides eficazes em processos de controle fotooxidativos, a baixa intensidade de radiação das condições do experimento, provavelmente, interferiu nessa diferença encontrada entre os conteúdos de clorofila e carotenóides, pelo não requerimento de controle fotooxidativo, tal qual necessário em condições de maior intensidade de radiação.

Embora os carotenóides tenham alta importância biológica para as plantas, estudos que relacionam o conteúdo desse pigmento em plantas de tomateiro fitocromo-mutantes dão ênfase quase que exclusivamente ao conteúdo nos frutos, possivelmente pela sua importância nutricional na alimentação humana. Neste trabalho, *hp1* deteve o maior conteúdo de carotenóides totais foliares em relação aos demais microtomateiros (Figura 7), comportamento similar àquele encontrado em frutos de tomateiro desse mesmo mutante, quando comparado a plantas selvagens, em estudo desenvolvido por Liu et al. (2004). Estes autores apontam dois genes responsáveis pela regulação da síntese de

carotenóides, os quais, provavelmente, constituem o principal fator envolvido com a síntese de carotenóides nas mutações de plantas fitocromo-mutantes: a repressão de *LeHY5* exibe decréscimo no acúmulo de carotenóide (sendo este, portanto, um gene de regulação positiva) e a repressão de *LeCOPILIKE* exibe resultado de aumento de conteúdo de carotenóides nos frutos, caracterizando ser um gene de regulação negativa.



**FIGURA 7.** Teor de carotenóides totais em folhas de microtomateiros selvagens e fitocromo-mutantes, em estágio de floração. Colunas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3 Considerações finais

Observando-se o desenvolvimento dos microtomateiros estudados neste trabalho, assim como os dados obtidos concernentes à caracterização estrutural e fisiológica, indicam-se estes como modelos viáveis a estudos de fotobiologia.

O comportamento peculiar expressado pelo mutante *aurea*, em relação aos demais microtomateiros estudados, por apresentar potencial fotossintético similar ao da cultivar selvagem, mesmo tendo um menor conteúdo de clorofilas merece destaque dentre as respostas obtidas. O maior conteúdo de nitrogênio e proteínas observados nesse mutante, relativo aos demais microtomateiros, sugere que a manutenção do alto potencial fotossintético tenha sido em função de uma maior alocação de nitrogênio em proteínas de importância nos processos de fotossíntese, capacidade esta que pode vir a ser explorada em processos de desenvolvimento de novas tecnologias de produção por meio de melhoramento vegetal.

O maior conteúdo de clorofilas a e b observado no mutante *atroviolacea* não refletiu em maior capacidade fotossintética, a qual se manteve similar à da cultivar selvagem. A maior densidade de cloroplasto em células do parênquima paliádico observada nesse mutante, possivelmente, é o principal fator relacionado ao seu maior conteúdo de clorofila. Uma observação peculiar a esse mutante foi a baixa razão clorofila a/b, a qual tem sido discutida em outras pesquisas como ocorrendo em função de aumento em complexos do fotossistema II, subsidiando um melhor desenvolvimento das plantas em condições ambientais de baixa intensidade de radiação. Embora tenha havido aumento na densidade de cloroplastos no parênquima paliádico das plantas *atroviolacea* mutantes e aumento no conteúdo de clorofilas, não se observou aumento no conteúdo de carotenóides, o qual geralmente apresenta uma correlação positiva ao conteúdo de clorofilas.

O mutante *hpl* se destacou entre os demais microtomateiros pelo mais alto potencial fotossintético e mais alto conteúdo de carotenóides foliares. No entanto, não se observou reflexo desse maior potencial fotossintético sobre os conteúdos de proteínas totais e açúcares solúveis. Os dados de caracterização deste mutante sugerem que este seja mais responsivo a eventos mediados por fitocromos sob baixa intensidade de radiação que o mutante *atv*.

## 5 CONCLUSÕES

Para as condições deste trabalho conclui-se que:

Diferentes aspectos anatômicos da epiderme foliar e de tecidos do mesofilo e ultra-estrutura de cloroplastos, assim como trocas gasosas, conteúdos de clorofila, carotenóides, nitrogênio total, proteínas totais e açúcares solúveis totais são características estruturais e fisiológicas que sofrem modificações diferenciadas em microtomateiros, quando das diferentes mutações em fitocromo.

Embora ambos os mutantes *hp1* e *atroviolacea* sejam supra-responsivos a eventos desencadeados por fitocromos, são distintos em diversos aspectos estruturais e fisiológicos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. M. Photoregulation of the composition, function, and structure of thylacoid membranes. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 93-136, 1986.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-15, Jan. 1949.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AND AGRICULTURAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 10<sup>th</sup>ed. Washington, 1970.

BECKER, T. W.; FOYER, C.; CABOCHE, M. Light-regulated expression of nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient aurea mutant of tomato. **Planta**, v. 188, p. 39-47, 1992.

BIDWELL, R. G. S. Protein synthesis and turn over in cultured plant tissue: source of carbon and fate of protein breakdown products. **Nature**, v. 203, p. 367-373, 1964.

BOLTON, J. K.; BROWN, R. H. Photosynthesis of grass species differing in carbon dioxide fixation pathways V. Response of panicum maximum, panicum milioides, and tall-fescue (*Festuca arundinacea*) to nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v. 66, p. 97-100, 1980.

BUISSON, D.; LEE, D. W. The developmental responses of papaya leaves to simulated canopy shade. **American Journal of Botany**, v. 80, p. 947-952, 1993.

BRIGGS, W.; OLNEY, M. A. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. **Plant Physiology**, v. 125, p. 85-88, 2001.

CARVALHO, R. F. **Uso de mutantes fotomorfogénicos no estudo da competência para regeneração in vitro em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)**. 2003. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; MELO, H. C.; SOARES, Â. M.; ALVARENGA, A.A. LIMA JÚNIOR, É, C. Aspectos anatômicos e fisiológicos de plantas de guaco submetidas a diferentes fotoperíodos. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 846-850, 2005.

CHEN, M.; CHORY, J.; FANKHAUSER, C. Light signal transduction in higher plants. **Annual Review Genetics**, v. 38, p. 87-117, 2004.

CHOW, W. S.; MELIS, A.; ANDERSON, J. M. Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 87, p. 7502-7506, 1990.

CLARK, J.; LISTER, G. Photosynthetic action spectra of trees. **Plant Physiology**, v. 55, p. 407-413, 1975.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**. Parte I – células e tecidos. 2.ed. São Paulo: Roca, 1986. 304p.

DALE, J. E. The control of leaf expansion. **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 267-295, 1988.

DELIEU, T.; WALKER, D. A. Polarographic measurement of photosynthesis oxygen evolution by leaf discs. **New Phytologist**, Cambridge, v. 89, n. 2, p. 165-178, 1981.

DELIEU, T.; WALKER, D. A. Simultaneous measurement of oxygen evolution and chlorophyll by fluorescence from leaf pieces. **Plant Physiology**, Rockville, v. 73, n. 3, p. 534-541, 1983.

DIJKWEL, P. P.; HUIJSER, C.; WEISBEEK, P. J.; CHUA, N.; SMEEKENS, S. C. M. Sucrose control of phytochrome a signaling in arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 9, p. 583-595, 1997.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-512.

EVANS, J. R.; SEEMAN, J. R. Differences between wheat genotypes in specific activity of RuBP carboxylase and the relationship to photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 74, p. 759-765, 1984.

GONÇALVES, L. D.; MALUF, W. R.; CARDOSO, J. T. V. R.; CASTRO, E. M.; SNATOS, N. M.; NASCIMENTO, I. R.; FARIA, M. V. Relação entre zingibereno, tricomas foliares e repelência de tomateiros a *Tetranychus evansi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.2, p. 267-273, 2006.

GUIDI, L.; DEGL'INNOCENTI, E.; SOLDATINI, G. F. Assimilation of CO<sub>2</sub>, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high and ozone. **New Phytologist**, Cambridge, v. 156, n. 3, p. 377-388, Dec. 2002.

HALL, A.; KOZMA-BOGNÁR, L.; TOÓTH, R.; NAGY, F.; MILLAR, A. J. Conditional circadian regulation of phytochrome gene expression. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1808-1818, 2001.

HALLIDAY, J. K.; SALTER, M. G.; THINGNAES, E.; WHITELAN, G. C. Phytochrome control of flowering in temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. **Plant Journal**, v. 33, p. 875-885, 2003.

HAUKE, V.; SCHREIBER, L. Ontogenetic and seasonal development of wax composition and cuticular transpiration of ivy (*Hedera helix* L.) sun and shade leaves. **Planta**, v. 207, p. 32-41, 1998.

HIGBY, W. K. A simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 27, p. 42-49, 1962.

HOFLACHER, H.; BAUER, H. Light acclimation in leaves of the juvenile and adult life phases of ivy (*Hedera helix*). **Physiologia Plantarum**, v. 56, p. 177-182, 1982.

HUUB, L.; KERCKHOFFS, J.; KENDRICK, R. E. Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato. **Journal of Plant Research**, v. 110, n. 1, p. 141-149, 1997.

JANOUDI, A-K.; KONJEVIC, R.; WHITLAM, G. C.; GORDON, W.; POFF, K. L. Both phytochrome A and B are required for the normal expression of phototropism in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 101, p. 278-282, 1997.

JONHSON, H. B. Plant pubescence: an ecological perspective. **Botanical Review**, v. 41, p. 233-258, 1975.

KADOTA, A.; SATO, Y.; WADA, M. Intracellular chloroplast fotorelocation in the moss *Phycomitrella patens* is mediated by phytochrome as well by a blue-light receptor. **Planta**, v. 210, p. 932-937, 2000.

KASAHARA, M.; KAGAWA, T.; SATO, Y.; KIOSUE, T.; WADA, M. Phototropins mediate blue and red light-induced chloroplast movements in *Physcomitrella patens*. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1388-1397, 2004.

KASPERBAUER, M. J.; HAMILTON, J. L. Chloroplast structure and starch grain accumulation in leaves that received different red and far-red levels during development. **Plant Physiology**, v. 74, p. 967-970, 1984.

KASPERBAUER, M. J.; HUNT, P. G. Far-red light affects photosynthate allocation and yield of tomato over red mulch. **Crop Science**, v. 38, p. 970-974, 1998.

KEN-DROR, S.; HORWITZ, B. A. Altered phytochrome regulation of greening in an aurea mutant of tomato. **Plant Physiology**, v. 92, p. 1004-1008, 1990.

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

KENDRICK, R. E.; PETERS, J. L.; KERCKHOFFS, L. H. J.; VAN TUINEN, A.; KORNEEF, M. Photomorphogenic mutants of tomato. **Biochemical Society Symposia**, v. 60, p. 249-256, 1994.

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

KERCKHOFFS, L. H.; KELMENSEN, P. M.; SCHREUDER, M. E.; KENDRICK, C. I.; KENDRICK, R. E.; HANHART, C. J.; KORNEEF, M.; PRATT, L. H.; CORDONNIER-PRAT, M. M. Characterization of the gene encoding the apoprotein of phytochrome B2 in tomato, and identification of molecular lesions in two mutant alleles. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 901-907, 1999.

KIM, G.-T.; YANO, S.; KOZUKA, T.; TSUKAYA, K. Photomorphogenesis of leaves: shade-avoidance and differentiation of sun and shade leaves.

**Photochem. Photobiology Science**, v. 4, p. 770-774, 2005.

KJELDAHL, J. Z. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 22, p. 366, 1883.

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

KOZUKA, T.; HORIGUCHI, G.; KIM, G.-T.; OHGISHI, M.; SAKAI, T.; TSUKAYA, H. The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 213-223, 2005.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Physiology of wood plants**. New York: Academic, 1979. 811 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIM, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica, RJ: EDUR, 1997. 198 p.

LABOREAU, L. G.; OLIVEIRA, J. G.; SALGADO-LABOREAU, M. L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-257, 1961.

LEE, D. W. Simulating forest shade to study the developmental ecology of tropical plants: juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, v. 4, p. 281-292, 1988.

LIMA JUNIOR, E. C.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2006.

LIU, Y.; ROOF, S.; ZHIBIAO, Y.; BARRY, C.; VAN TUINEN, A.; VREBALOV, J.; BOWLER, C.; GIOVANNONI, J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. **PNAS Plant Biology**, 2004. Disponível em: <[www.pnas.org/misc/rightperm.shtml](http://www.pnas.org/misc/rightperm.shtml)>. Acesso em: 13 nov. 2006.

LÓPEZ-JUEZ, E.; NAGATANI, A.; BUURMEIJER, W. F.; PETERS, J. L.; FERUYA, M.; KENDRICK, R. E.; WESSELIUS, J. C. Response of light-growth wild-type and aurea mutant tomato plants to end-of-day far-red light. **Journal Photochemistry and Photobiology**, v. 4, p. 391-405, 1990.

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

MARTÍ, E.; GISBERT, C.; BISHOP, G. J.; DIXON, M. S.; GARCÍA-MARTÍNEZ. Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 2037-2047, 2006.

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

NAGARAJAH, S. Differences in cuticular resistance in relation to transpiration in tea (*Camellia sinensis*). **Physiologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 89-92, 1979.

NAGATANI, A.; REED, J. W.; CHORY, J. Isolation and initial characterization of *Arabidopsis* mutants that are deficient in phytochrome A. **Plant Physiology**, v. 102, p. 269-277, 1993.

NAKAZONO, E. M.; COSTA, M. C.; FUTATSUGI, K.; PAULILO, M. T. S. Crescimento inicial de *Euterpe edulis* Mart. em diferentes regimes de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 173-179, 2001.

NASCIMENTO, E. AL.; PLIVEIRA, L. E. M.; CASTRO, E. M.; DELÚ FILHO, N.; MESQUITA, A. C.; VIEIRA, C. V. Alterações morfofisiológicas em folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) consorciado com seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 852-857, 2005.

OELZE-KAROW, H.; MOHR, H. Phytochrome action on chlorophyll synthesis – a study of the escape from photoreversibility. **Plant Physiology**, v. 70, p. 863-866, 1982.

PARK, Y.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. Chloroplast movement in the shade plant *Tradescantia albiflora* helps protect photosystem II against light stress. **Plant Physiology**, v. 111, p. 867-875, 1996.

PETERS, J. L.; SZELL, M.; KENRICK, R. E. The expression of light-regulated genes in the *high-pigment-1* mutant of tomato. **Plant Physiology**, v. 117, p. 797-807, 1998.

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

QUAIL, P. Photosensory perception and signaling in plant cells: new paradigms? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, p. 180-188, 2002.

RANWALA, D. N. K.; DECOTEAU, D. R.; RANWALA A. P.; MILLER, W. B. Changes in soluble carbohydrates during phytochrome-regulated petiole elongation in watermelon seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 157-163, 2002.

REED, J. W.; NAGPAL, P.; POOLE, D. S.; FURUYA, M.; CHORY, J. Mutation in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. **Plant Cell**, v. 5, p. 147-157, 1993.

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

RIZZINI, C. T. **Tratado de fotogeografia do Brasil**: aspectos ecológicos. São Paulo: Hucitec/EDUSP, 1976. 327 p.

ROBSON, P. R.; WHITELAM, G. C.; SMITH, H. Selected components of the shade-avoidance syndrome are displayed in a normal manner in mutants of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rupa* deficient in phytochrome B. **Plant Physiology**, v. 102, p. 1179-1184, 1993.

ROWLEY, C. R.; MORAN, D. T. A simple procedure for mouting wriing wrinkle-free sections on formar-coated slot grids. **Ultramicrotomy**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 151-155, 1975.

SCHITTENHELM, S.; MENGE-HARTMANN, U.; OLDENBURG, E. Photosynthesis, Carbohydrate Metabolism, and Yield of Phytochrome-B-Overexpressing Potatoes under Different Light Regimes. **Crop Science**, v. 44, p. 131-143, 2004.

- SCOTT, J. W.; HARBAUGH, B. K. **Micro-Tom**. A miniature dwarf tomato. Florida: Florida Agricultural Experimental Station, 1989. p. 1-6. (Circular S-370).
- SEEMANN, J. R.; SHARKEY, T. D.; WANG, J.; OSMOND, B. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. **Plant Physiology**, v. 84, p. 796-802, 1987.
- SHARMA, R. Phytochrome: a serine kinase illuminates the núcleo. **Current Science**, v. 80, p. 178-188, 2001
- SHARMA, R.; LÓPEZ-JUEZ, E.; NAGATANI, A.; FURUYA, M. Identification of photo-inactive phytochrome A in etiolated seedlings and photo-active phytochrome B in green leaves of *aurea* mutant of tomato. **Plant Journal**, v. 4, p. 1035-1042, 1993.
- SHARROCK, R. A.; CLARCK, T. Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. **Plant Physiology**, v. 130, p. 442-456, 2002.
- SHINOMURA, T.; UCHIDA, K.; FURUYA, M. Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 147-156. 2000.
- SMITH, H. Light quality, photoreception and plant strategy. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 481-518, 1982.
- SMITH, H. Physiological and ecological function within the phytochrome family. **Annual Review Plant physiology Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 289-315, 1995.
- SRINIVAS, A.; BEHERA, R. K.; KAGAWA, T.; WADA, M.; SHARMA, R. P. High pigment1 mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. **Plant Physiology**, v. 134, p. 790-800, 2004.
- TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; VICENT, M. C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T. M.; GOVANNONI, J. J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; RODER, M. S.; WING, R. A.; WU, M.; YONG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

- TERASHIMA, I.; MIYAZAWA, S.-I.; HANBA, Y. T. Why are sun leaves thicker than shade leaves? Consideration based on analyses of CO<sub>2</sub> diffusion in the leaf. **Journal Plant Res.**, v. 114, p. 93-105, 2001.
- TERASHIMA, I.; SAKAGUCHI, S.; HARA, N. Intra-leaf and intracellular gradients in chloroplast ultrastructure of dorsiventral leaves illuminated from the adaxial or abaxial side during their development. **Plant Cell Physiology**, v. 27, p. 1023-1031, 1986.
- TERRY, M. J.; KENDRICK, R. E. The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21681-21686, 1996.
- TERRY, M. J.; KENDRICK, R. E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. **Plant Physiology**, v. 119, p. 143-152, 1999.
- THOMAS, R. L.; JEN, J. J. Phytochrome-mediated carotenoids biosynthesis in ripening tomatoes. **Plant Physiology**, v. 56, p. 452-453, 1975.
- TOMPSON, A.; HEPLER, R. W.; KERR, E. A. Clarification of the inheritance of high total carotenoid pigments in the tomato. **Proceedings of America Society for Horticultural Science**, v. 81, p. 434-442, 1962.
- TÓTH, R.; KEVEI, E.; HALL, A.; MILLAR, A. J.; NAGY, F.; KOZMA-BOGNAR, L. Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1607-1616, 2001.
- TSUKAYA, H.; KOZUKA, T.; KIM, G.-T. Genetic control of petiole length in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 1221-1228, 2002.
- VAN TUINEN, A.; CORDONNIER-PRATT, M. M.; PRATT, L. H.; VERKERK, R.; ZABEL, P.; KORNNNEEF, M. The mapping of phytochrome genes and photomorphogenetic mutants of tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, p. 115-122, 1977.
- VAN TUINEN, A.; KERCKHOFFS, L. H.; NAGATANI, A.; KENDRICK, R. E.; KOORNNEEF, M. Far-red light-insensitive, phytochrome A deficient mutants of tomato. **Mol. Gen. Genet.**, v. 246, p. 133-141, 1995.

WALKER, D. A.; WALKER, R. **The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis.** Sheffield, Second Impression, 1990. 203 p.

WALTERS, R. G.; ROGERS, J. J. M.; SHEPHARD, F.; HORTON, P. Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the role of photoreceptors. **Planta**, v. 209, p. 517-527, 1999.

WEHMEYER, B.; CASHMORE, A. R.; SCAFER, E. Photocontrol of the expression of genes encoding chlorophyll a/b binding proteins and small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in etiolated seedlings of *Lycopersicon esculentum* (L.) and *Nicotiana tabacum* (L.). **Plant Physiology**, v. 93, p. 990-997, 1990.

WERKER, E. Trichome diversity and development. In: HALLAHAN, D. L.; GRAY, J. C. (Ed.). **Plant trichomes.** London: Academic, 2000. p. 1-30.

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