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

**Desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais
de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**

Giselle Gomes Monteiro

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Giselle Gomes Monteiro
Licenciada em Ciências Biológicas

**Desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de
tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

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

Monteiro, Giselle Gomes

Desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de tomateiro
(*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) / Giselle Gomes Monteiro. - - Piracicaba, 2010.
113 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Fungos micorrízicos 2. Hormônios vegetais 3. Micorriza 4. Mutação genética
5. Reguladores vegetais 6. Tomate I. Título

CDD 635.642
M775d

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

*À minha amada mãe,
Gercina Gomes Monteiro
meu exemplo de Vida*

DEDICO

*Ao meu marido
Felipe José Cury Fracetto
por todo amor e companheirismo*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me dar força, proteção e amparo ao longo do meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pelos ensinamentos, confiança, orientação e, o mais importante, pela amizade e convívio pessoal.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) e ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida e por fornecer a estrutura para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Dr. Lázaro Peres por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos e participação em todas as fases da realização desta tese. Seu incentivo e entusiasmo foram fundamentais nos momentos de dificuldade, quanto tudo insistia em dar errado.

Ao Professor Dr. Fernando Andreote, por sempre estar disposto em ajudar.

Ao Professor Dr. Lucas Abreu pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários Denise e Fernando por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho na casa-de-vegetação e laboratório.

À Deborah Nishimura, pelo auxílio no Real Time.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia Molecular que se tornaram grandes amigos: Adriano, Gisele, Vívian, Elisa, Alice, Joze, Rafael Valadares, Rafael Armas, Kelly, Winston, Silvia, Sandra, Maryeimy e Éder.

À minha mãe, por tudo que ela representa, por todo amor, carinho, dedicação e todas as lições de vida que sempre me proporcionou.

Ao meu eterno amor, Felipe Cury Fracetto, pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis. Pela ajuda intensa na casa-de-vegetação, plantando e lavando tomates e por fazer da nossa lua-de-mel a finalização desta tese.

À minha querida família, pessoas essenciais na minha vida, que sempre torceram por mim.

À minha segunda família, Jenice, Osmair, Josiane, Giuseppe, Fofó e Fofô, Vó Lourdes, pelo carinho e cuidado que sempre tiveram comigo.

À minha irmã, amiga, cúmplice, afilhada e madrinha Mary Anne, pela incondicional amizade, pela força e por todas as palavras de carinho.

À minha querida amiga e madrinha Ana Cláudia, pela sua amizade e pelo grande carinho. Amizade eterna!

Aos queridos amigos Simone e Lucas, que sempre estiveram do meu lado.

Aos meus amigos de Belo Horizonte: Caio, Tatiana, Fábio, Marlene, Rodrigo, Dedéia, Jayminho e Viviane, que apesar da distância, sempre estão presentes.

Às queridas Neginhas, Elisa, Vívian, Layanne e Fabiana, grandes amigas que fiz em Piracicaba.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Revisão bibliográfica	14
1.1.1 Micorrizas arbusculares: aspectos gerais.....	14
1.1.2 Desenvolvimento das MAs	15
1.1.3 Regulação do desenvolvimento de MAs	19
1.1.3.1 Regulação por etileno.....	20
1.1.3.2 Regulação por ácido abscísico (ABA)	23
1.1.3.3 Regulação pelo sistema de defesa vegetal	24
1.1.4 Micro-Tom como modelo vegetal para estudo da simbiose	26
Referências	28
2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA DE DEFESA VEGETAL EM MUTANTES DE TOMATEIRO <i>epinastic</i> E <i>Never ripe</i> COLONIZADOS POR <i>Glomus clarum</i>	41
Resumo	41
Abstract	42
2.1 Introdução	43
2.2 Desenvolvimento	46
2.2.1 Material e Métodos	46
2.2.1.1 Material vegetal e Fungo Micorrízico Arbuscular.....	46
2.2.1.2 Instalação dos experimentos e condições de crescimento.....	46
2.2.1.3 Avaliação da colonização micorrízica.....	47
2.2.1.4 Análises estatísticas	49
2.2.1.5 Extração de RNA e síntese de cDNA	49
2.2.1.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	49
2.2.2 Resultados	52
2.2.2.1 Biomassa vegetal da parte aérea	52
2.2.2.2 Colonização fúngica intrarradicular e funcionalidade da simbiose	52
2.2.2.3 Expressão diferencial de genes relacionados à defesa vegetal	60

2.2.3 Discussão	66
2.2.3.1 Colonização micorrízica em mutantes hormonais de tomateiro.....	66
2.2.3.2 Expressão diferencial de genes que codificam quitinases e β -1,3-glucanase ...	67
2.2.3.3 Expressão diferencial de genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.....	69
2.3 Conclusões	72
Referências.....	73
3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS AS VIAS DE BIOSSÍNTESE DE ETILENO E ÁCIDO ABSCÍSIKO EM MUTANTES DE TOMATEIRO <i>epinastic</i>, <i>notabilis</i> E <i>sitiens</i> COLONIZADOS POR <i>Glomus clarum</i>.....	79
Resumo	79
Abstract.....	80
3.1 Introdução.....	81
3.2 Desenvolvimento	84
3.2.1 Material e Métodos	84
3.2.1.1 Material vegetal e Fungo Micorrízico Arbuscular	84
3.2.1.2 Instalação dos experimentos e condições de crescimento	84
3.2.1.3 Avaliação da colonização micorrízica	85
3.2.1.4 Análises estatísticas	86
3.2.1.5 Extração de RNA e síntese de cDNA	88
3.2.1.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	88
3.2.2 Resultados.....	90
3.2.2.1 Biomassa vegetal da parte aérea	90
3.2.2.2 Colonização micorrízica e funcionalidade da simbiose.....	91
3.2.2.3 Expressão diferencial de genes relacionados à via da biossíntese de etileno e do ácido abscísico	96
3.2.3 Discussão	100
3.3 Conclusões	105
Referências.....	106

RESUMO

Desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)

Os hormônios vegetais etileno e ABA são possíveis reguladores chave do desenvolvimento das micorrizas arbusculares (MAs). O primeiro objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento da MA em mutantes superprodutores e insensíveis ao etileno (*epinastic* e *Never ripe*, respectivamente) e verificar se enzimas relacionadas ao sistema de defesa vegetal são reguladas diferencialmente pelo etileno durante o desenvolvimento da simbiose. A colonização de raízes de *epinastic* (*epi*) por *G. clarum* foi significativamente reduzida quando comparada com Micro-Tom (MT), além disso, a funcionalidade da simbiose, demonstrada pelo acúmulo de transcritos de *LePT4*, foi fortemente reduzida quando comparada com MT. Por outro lado, o padrão de colonização e funcionalidade da simbiose no mutante *Nr* não diferiu de MT. Indução no acúmulo de transcritos de genes que codificam quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foi observada no mutante *epi*, enquanto o acúmulo de transcritos de uma β -1,3-glucanase foi fortemente induzido no mutante *Nr*. O segundo objetivo foi verificar se a colonização reduzida observada em mutantes deficientes em ABA é dependente da produção do etileno. Para tanto, mutantes que diferem na deficiência de ABA e produzem diferentes quantidades de etileno (*notabilis* e *sitiens*) e o mutante *epi* foram inoculados com *G. clarum* e tratados com aminoethoxivinilglicina (AVG), um inibidor de etileno. A colonização intrarradicular de *G. clarum* nos mutantes *epi* e *notabilis* (*not*) foi significativamente reduzida quando comparada com MT, sendo que o mutante *sitiens* (*sit*) foi o menos susceptível à colonização em relação aos demais genótipos. A aplicação de AVG a 10 μ M restaurou completamente a colonização em *epi*, mas não nos mutantes deficientes em ABA. O acúmulo de transcritos de *LePT4* confirmou os resultados de colonização. Os genes que codificam enzimas chave na biossíntese do etileno, *LeACS2* e *LeACO4*, foram regulados positivamente pela inoculação com *G. clarum*, e a restauração do desenvolvimento da MA observada em *epi* que recebeu AVG, provavelmente envolveu ACC oxidase (*LeACO4*). O acúmulo de transcritos dos genes que codificam ACC oxidase (*LeACO1* e *LeACO4*) foi induzido significativamente em *sit*, mostrando que a superprodução de etileno observada neste mutante pode envolver a regulação da ACC oxidase. Por fim, indução no acúmulo de transcritos do gene *LeNCED* foi observada em todos os genótipos micorrizados e em raízes de *epi* que receberam AVG, demonstrando que *LeNCED* é regulado positivamente pela inoculação com *G. clarum* e que o etileno regula a expressão deste gene. Os resultados demonstram que etileno e ABA estão envolvidos na regulação do desenvolvimento de MA e que etileno modula a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa vegetal permitindo o estabelecimento de uma simbiose funcional.

Palavras chave: Etileno; Ácido abscísico; *epinastic*; *Never ripe*; *notabilis*; *sitiens*, Genes de defesa vegetal; ACC sintase; ACC oxidase; 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED)

ABSTRACT

Development of arbuscular mycorrhiza in hormonal mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)

The plant hormones ethylene and ABA are probably key developmental regulators of arbuscular mycorrhizae (AM). The first objective of this work was to evaluate the development of MA in overproducing and insensitive mutants to ethylene (*epinastic* and *Never ripe*, respectively) and verify if enzymes related to plant defense system are differentially regulated by ethylene during the symbiosis development. The colonization of *epinastic* (*epi*) roots by *G. clarum* was significantly reduced when compared with Micro-Tom (MT), moreover, the functionality of the symbiosis as demonstrated by transcripts accumulation of *LePT4*, was strongly reduced when compared with MT. Still, the pattern of colonization and functionality of the symbiosis in the *Nr* mutant did not differ from MT. Induction in the transcripts accumulation of genes encoding chitinase and enzymes related to oxidative stress was observed in *epi* mutant, whereas transcripts accumulation of β -1, 3-glucanase was strongly induced in the *Nr* mutant. The second objective was to determine whether the reduced colonization observed in mutants deficient in ABA is dependent on ethylene production. For this purpose, mutants that differ in ABA deficiency and produce different amounts of ethylene (*notabilis* and *sitiens*) and the *epi* mutant were inoculated with *G. clarum* and treated with an ethylene inhibitor called aminoethoxivinylglicin (AVG). The intraradical colonization of *G. clarum* in *epi* and *notabilis* (*not*) mutants was significantly reduced when compared with MT and *sitiens* mutant was less susceptible to colonization in comparison with other genotypes. The application of AVG to 10 μ M completely restored the colonization in the *epi* but not in mutants deficient in ABA. The transcripts accumulation of *LePT4* confirmed the results of colonization. The genes that encode key enzymes in the biosynthesis of ethylene, *LeACS2* and *LeACO4*, were positively regulated by inoculation with *G. clarum* and the restoration in the development of MA observed in *epi* which received AVG probably involved ACC oxidase (*LeACO4*). Transcripts accumulation of genes that encode ACC oxidase (*LeACO1* and *LeACO4*) were induced significantly in *sit* showing that overproduction of ethylene in this mutant can involve ACC oxidase. Finally, the induction in the accumulation of gene transcripts *LeNCED* was observed in all genotypes and mycorrhizal roots of *epi* which received AVG demonstrating that *LeNCED* is regulated positively by the inoculation with *G. clarum* and that ethylene regulates the expression of this gene. Results show that ethylene and ABA are involved in regulating of MA development and ethylene modulates the expression of genes related to the plant defense system allowing the establishment and functionality of the symbiosis.

Keywords: Ethylene; Absciscic acid; *epinastic*; *Never ripe*; *notabilis*; *sitiens*; Plant defense genes; ACC synthase; ACC oxidase; 9-cis-epoxycarotenóide dioxygenase (NCED)

1 INTRODUÇÃO

As micorrizas arbusculares (MAs) são associações simbióticas mutualísticas entre fungos do filo Glomeromycota e a maioria das plantas terrestres. Elas podem contribuir para o aumento da sobrevivência e adaptação das plantas a ambientes limitantes, principalmente devido a sua maior capacidade em absorver nutrientes do solo. A natureza biotrófica obrigatória dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) tem limitado os avanços na compreensão e aplicação da simbiose na agricultura.

A formação e o funcionamento das MAs depende de um complexo processo de troca de sinais, o que resulta em mudanças no metabolismo dos simbiontes e na diferenciação de uma interface simbiótica no interior das células das raízes. Os mecanismos que regulam a formação das MAs são pouco conhecidos, mas sabe-se que a concentração de fosfato (P) na planta é determinante para o desenvolvimento da simbiose. A disponibilidade de P na planta pode afetar o balanço de açúcares e de fitormônios, além da expressão de genes de defesa vegetal.

Os hormônios vegetais etileno e ABA são possíveis reguladores chave do desenvolvimento das micorrizas arbusculares, entretanto seus papéis em MA ainda não são bem compreendidos. Este trabalho teve como primeiro objetivo avaliar o desenvolvimento da MA utilizando mutantes hormonais de tomateiro da cultivar Micro-Tom superprodutor e insensível ao etileno (*epinastic* e *Never ripe*, respectivamente) e verificar se o etileno modula a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa vegetal em raízes micorrizadas. Sabendo-se que as vias de sinalização de ABA e etileno interagem antagonicamente, e que mutantes deficientes em ABA têm uma alta produção de etileno, o segundo objetivo deste trabalho foi verificar se a redução na colonização micorrízica observada em mutantes deficientes em ABA é devido ao maior acúmulo de etileno. Para tanto, a colonização micorrízica foi avaliada nos mutantes deficientes em ABA (*notabilis* e *sitiens*) e *epinastic*, e a expressão de genes que codificam enzimas chave na biossíntese destes dois hormônios foi determinada por PCR quantitativo em tempo real.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Micorrizas arbusculares: aspectos gerais

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pertencem ao filo Glomeromycota, ordem Glomerales (SCHUSSLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001) e podem formar associações com mais de 80% de espécies vegetais (SMITH; READ, 2008). O desenvolvimento simbiótico resulta na formação de estruturas especializadas e altamente ramificadas denominadas arbúsculos que é o principal local de troca de nutrientes entre a planta e o FMA (PARNISKE, 2008). Esta associação simbiótica denominada micorriza arbuscular (MA) conecta a planta em uma rede de hifas do fungo, que pode ser superior a 100 metros de hifas por centímetro cúbico do solo (MILLER; REINHARDT; JASTROW, 1995). Esta rede de hifas é especializada para absorção de nutrientes (predominantemente fosfato) e água (FINLAY, 2008). Estima-se que até 20% dos produtos da fotossíntese das plantas terrestres são consumidos pelos FMAs (BAGO; PFEFFER; SHACHAR-HILL, 2000). Por isso, a simbiose MA contribui significativamente para ciclagem global de fosfato e carbono e influencia a produtividade primária em ecossistemas terrestres (FITTER, 2005). As MAs também tem sido associadas ao aumento da nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas (FINLAY, 2004), ao biocontrole de certos patógenos e pragas, à diminuição dos estresses hídricos (AHONEN-JONNARTH; GÖRANSSON; FINLAY, 2003; MARULANDA; AZCON; RUIZ-LOZANO, 2003; PORCEL; RUIZ-LOZANO, 2004) e por metais pesados (HILDERBRANDT; REGVAR; BOTHE, 2007).

Pirozynski e Malloch (1975) foram os primeiros a propor que as MAs co-evoluíram com a colonização de ambientes terrestres pelas plantas. Evidências para esta hipótese vêm sendo acumuladas por exames de fósseis (REMY et al., 1994) e por estudos de filogenia (SIMON et al., 1993). Apesar das plantas hospedeiras serem capazes de completar seu ciclo de vida na ausência do fungo, essa simbiose se mantém ao longo da evolução das plantas terrestres, o que é um indicativo de uma associação altamente bem-sucedida.

Os FMAs são biotróficos obrigatórios, mas seus esporos são capazes de germinar na ausência da planta hospedeira, dependendo, portanto de um parceiro de vida fotoautotrófica para completar seu ciclo de vida e produzir a próxima geração de esporos (HARRISON, 2005). Entretanto, a presença de exsudados de raízes ou de compostos voláteis, como o CO₂, pode estimular a germinação dos esporos e o crescimento do tubo germinativo (BÉCARD; PICHÉ, 1989; GIANINAZZI-PEARSON; BRANZANTI; GIANINAZZI, 1989; NAIR; SAFIR; SIQUEIRA, 1991). Além disso, foi observado por Hildebrandt et al. (2006) que uma co-cultura com *Paenibacillus validus* levou a produção de esporos secundários e infectivos na ausência do hospedeiro.

Apesar de não ocorrerem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas por FMAs, a formação das MAs é acompanhada de consideráveis mudanças no metabolismo de ambos os simbiossitos e pela diferenciação de uma interface simbiótica ao redor dos arbúsculos (HARRISON, 2005). A formação de MAs é um processo complexo, cujos mecanismos de regulação são poucos conhecidos. O avanço das pesquisas nessas áreas tem sido limitado pela impossibilidade de manipulação genética dos FMAs. Entretanto, a identificação de mutantes vegetais defectivos na formação de MAs e o advento da genômica e proteômica têm propiciado um avanço considerável do conhecimento dos mecanismos de regulação do desenvolvimento e da fisiologia de MAs.

1.1.2 Desenvolvimento das MAs

A formação de uma MA funcional é um processo altamente regulado, o qual é acompanhado por modificações bioquímicas em ambos os organismos durante a simbiose (MARTIN-LAURENT et al., 1997; LIU et al., 2003). O primeiro passo para o desenvolvimento da simbiose é o reconhecimento mútuo entre a planta e o fungo que se inicia antes do contato físico entre os parceiros. A raiz do hospedeiro libera moléculas sinais, conhecidas como fatores de ramificação, que induzem o desenvolvimento das hifas. Sabe-se que as estrigolactonas são as moléculas responsáveis pela indução da ramificação da hifa (AKIYAMA; MATSUZAKI; HAYASHI, 2005). Além disso, as estrigolactonas causam aumento na densidade e atividade de

mitocôndrias nas hifas de *Gigaspora rosea*, sugerindo que elas podem estimular o catabolismo de lipídeos do fungo na fase pré-simbiótica (BESSERER et al., 2006).

As estrigolactonas também são conhecidas pela sua capacidade em estimular a germinação de sementes das plantas parasitas *Striga* e *Orobancha*, e sua síntese é induzida em condições limitantes de fosfato inorgânico, as quais favorecem a proliferação dessas plantas parasitas (YONEYAMA; TAKEUCHI; YOKOTA, 2001). As vias metabólicas que levam a biossíntese de estrigolactonas não são totalmente conhecidas, mas o uso de mutantes de milho defectivos no metabolismo de carotenóides demonstrou que elas são derivadas das vias biossintéticas dos carotenóides (MATUSOVA et al., 2005).

O processo de comunicação entre os simbioses envolve não somente moléculas da planta, mas também sinais moleculares de origem fúngica. Em raízes transgênicas de *Medicago truncatula*, contendo o sistema repórter p*MtENOD11-gusA*, foi observado que os FMAs produzem uma molécula difusível em meio de cultura capaz de ativar a expressão de *MtENOD11*. O gene *MtENOD11* codifica uma proteína rica em hidroxiprolina, componente da matriz extracelular que tem a sua expressão induzida durante o desenvolvimento de MAs e na presença de fatores Nod (JOURNET et al., 2001; CHABAUD et al., 2002; KOSUTA et al., 2003).

O fato de alguns mutantes de leguminosas não-nodulantes (*nod⁻*) serem incapazes de formar MAs (*myc⁻*) sugere que parte das vias de transdução de sinais nas duas simbioses é comum (LAMBAIS, 2006). Pelo menos sete genes que são requeridos tanto para formação de MA quanto para nodulação já foram identificados em leguminosas (KISTNER et al., 2005). Estes genes codificam proteínas que estão diretamente ou indiretamente envolvidas em uma rede de transdução de sinais que é requerida para o desenvolvimento de estruturas de acomodação intracelulares. Os mutantes *dmi* de *M. truncatula* e os *Ljsym* de *Lotus japonicus* são fenotipicamente similares ao primeiro mutante *myc⁻* de ervilha e têm o processo de infecção bloqueado no estágio de penetração das células epidérmicas (HARRISON, 2005). Análises fenotípicas dos mutantes simbióticos de *M. truncatula* mostram que os genes *SYM*, *DMI2* e *DMI3* são requeridos para indução do aparato de pré-penetração (PPA) (GENRE et al., 2005) e que *DMI3* é requerido para ativar um conjunto de genes durante

a formação de PPA (SICILIANO et al., 2007). Análises de transcriptoma revelaram que a maioria dos genes MA-induzidos não são ativados em mutantes *sym* (LIU et al., 2003; KISTNER et al., 2005; SICILIANO et al., 2007). Similarmente, a resposta transcricional a fatores Nod é em grande parte suprimida (MITRA; SHAW; LONG, 2004).

O genes *DMI2* de *M. truncatula* e seu ortólogo *SYMRK* de *L. japonicus* codificam receptores transmembrânicos com atividade quinase de proteínas essenciais para a formação de MAs e nódulos (STRACKE et al., 2002). A caracterização do gene *SYMRK* permitiu a identificação de um domínio extracelular rico em leucina que estaria envolvido na percepção de moléculas sinais (fator Nod e, ou, um possível fator Myc), um domínio transmembrânico e um domínio quinase de proteína intracelular, o qual permite a transdução dos sinais moleculares (YOSHIDA; PARNISKE, 2005). Porém, o complexo protéico necessário para o reconhecimento do fator Nod é formado pelo produto de dois outros genes: *LjNFR1* e *LjNFR5*. Mutantes *nfr1* e *nfr5* não respondem aos fatores Nod, mas podem formar MAs, o que sugere que estas proteínas estão especificamente envolvidas na percepção do sinal bacteriano e não interferem na percepção do fator Myc (MADSEN et al., 2003; RADUTOIU et al., 2003).

Outro gene essencial para o desenvolvimento de nódulos e MAs em *M. truncatula* é *DMI1* (ENDRE et al., 2002). A proteína codificada por *DMI1* atua após *DMI2/SYMRK* na cascata de transdução do sinal molecular e codifica um provável canal de cátions, possivelmente envolvido na oscilação da concentração de Ca^{+2} ("Ca⁺² spiking") no citoplasma vegetal (OLDROYD; DOWNIE, 2004). Em raízes de *M. truncatula*, a proteína DMI1 está localizada na membrana nuclear (RIELY et al., 2007). Porém, dois genes homólogos à *DMI1*, *CASTOR* e *POLLUX*, identificados em *L. japonicus*, codificam proteínas localizadas em plastídios, podendo não ser as responsáveis pela oscilação da concentração de Ca^{+2} no citoplasma (IMAIZUMI-ANRAKU et al., 2005). Apesar de não ter sido demonstrado que as oscilações de Ca^{+2} são essenciais para a formação de MAs, o fato do gene *Nup133* de *L. japonicus*, que codifica uma nucleoporina localizada no envelope nuclear das células das raízes, ser necessário para as oscilações de Ca^{+2} , aliado ao fato que mutantes *nup133* não formarem MAs, sugere que as oscilações de Ca^{+2} são também essenciais para o desenvolvimento das MAs (KANAMORI et al., 2006).

O gene *DMI3* de *M. truncatula* também é essencial para o desenvolvimento de MAs. Este gene possui alta similaridade com genes que codificam quinases de proteínas dependentes de cálcio e calmodulina (CCAMKs – *calcium/calmodulin-dependent protein kinases*), cuja localização é nuclear. Mutantes *dmi3* apresentam oscilações da concentração de Ca^{+2} no citoplasma, mas não expressam genes de nodulinas precoces. É possível que *DMI3* seja essencial para o reconhecimento dos padrões das oscilações da concentração de Ca^{+2} no citoplasma e ative fatores de transcrição específicos para a regulação de genes envolvidos em nodulação, como *NSP1* e *NSP2*, e para a formação de MAs ainda desconhecidos (LEVY et al., 2004; KIRIACHEK et al., 2009).

Após o reconhecimento de moléculas sinais das plantas pelos FMAs ocorre a diferenciação do apressório, que tem início logo após o contato da hifa com a superfície da raiz e envolve trocas de sinais bioquímicos entre os simbiontes (REQUENA et al., 2002; GIANINAZZI-PEARSON; BRECHENMACHER, 2004). O apressório é formando somente na presença de tecidos radiculares, não sendo observado em superfícies sintéticas, mesmo na presença de exsudados radiculares que estimulam o crescimento da raiz (HARRISON, 1999). Além disso, o fungo reconhece especificamente o tipo de célula, não formando apressório sobre a parede de células corticais e vasculares (GADKAR et al., 2001). Os apressórios formados em fragmentos de parede celular desenvolvem hifas que não penetram completamente na célula e não se diferenciam em arbúsculos, sugerindo que o desenvolvimento dos arbúsculos requer células intactas (HARRISON, 1999). Sendo assim, a penetração e o crescimento dos FMAs no córtex radicular são pré-requisitos para o desenvolvimento de arbúsculos (GENRE; BONFANTE, 2002).

Durante a infecção pelo FMA, a planta prepara ativamente o ambiente intracelular para penetração da hifa do fungo micorrízico. As células da planta produzem um aparato de pré-penetração (PPA) que é uma estrutura subcelular que predetermina a trajetória do crescimento do fungo na célula da planta e é formado 4-5 horas depois da formação do apressório (GENRE et al., 2005; GENRE et al., 2008). A formação do PPA é precedida por uma migração do núcleo da célula da planta em direção ao ponto de entrada do fungo. O núcleo então move anterior ao

desenvolvimento do PPA, como se conduzisse a direção do seu crescimento através da célula. Somente depois que este aparato é formado, a hifa fúngica pode penetrar na célula do hospedeiro. No entanto, os sinais que ativam a formação do PPA são desconhecidos.

Após a formação do apressório na epiderme e penetração na raiz, a hifa cresce intercelularmente, acomodando-se entre as paredes celulares do tecido vegetal e alcançando o córtex, onde ocorre também colonização intracelular. No interior de algumas células corticais, a intensa divisão dicotômica do ápice da hifa, juntamente com o rearranjo da parede e membrana celular vegetal, origina-se o arbúsculo.

A diferenciação do arbúsculo é acompanhada por várias mudanças fisiológicas na célula vegetal, cujo vacúolo torna-se muito fragmentado e o volume do citoplasma e número de organelas aumentam (BONFANTE; PEROTTO, 1995). O núcleo de células contendo arbúsculos normalmente mostra hipertrofia e altos níveis de atividade transcricional (LINGUA; FUSCONI; BERTA, 2001; BONFANTE; PEROTTO, 1995; BALESTRINI; BERTA; BONFANTE, 1992). A ativação do ciclo do ácido tricarboxílico mitocondrial e biossíntese de ácido graxo, aminoácidos e apocarotenóide nos plastídeos indicam uma forte indução do metabolismo da planta (LOHSE et al., 2005). Rearranjo do citoesqueleto também tem sido observado durante o desenvolvimento e senescência do arbúsculo (GENRE; BONFANTE, 1997), assim como ao redor de células contendo arbúsculos (BLANCAFLOR; ZHAO; HARRISON, 2001). Os arbúsculos senescem e são degradados entre 4 e 12 dias após sua formação. Após a degradação do arbúsculo, a célula vegetal retoma seu metabolismo normal e está apta para abrigar um novo arbúsculo (KIRIACHEK et al., 2009).

1.1.3 Regulação do desenvolvimento de MAs

É bem documentado que o estabelecimento e desenvolvimento das MAs é altamente modulada pela concentração de P nas plantas (LAMBALIS, 2006; JAVOT; PUMPLIN; HARRISON, 2007). Entretanto, os mecanismos moleculares pelo qual P controla o desenvolvimento das MAs são desconhecidos. Lambais e Mehdy (1993) sugerem um modelo para explicar o mecanismo do controle da simbiose envolvendo P,

fitormônios e o sistema de defesa vegetal. Segundo estes autores, a concentração de P na planta afeta a expressão de genes envolvidos na defesa vegetal, que poderiam regular o crescimento fúngico intrarradicular. Além disso, a modulação da expressão de genes de defesa pelo P pode envolver alterações no balanço de fitormônios nos tecidos vegetais. De maneira geral, os FMAs poderiam causar alterações no balanço de fitormônios nas raízes, alterando a expressão de genes de defesa vegetal ou genes simbiose-específicos e regulando o desenvolvimento da simbiose (LAMBAIS; MEHDY, 1993).

1.1.3.1 Regulação por etileno

Existem evidências de que etileno, um fitormônio gasoso com várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, pode ter um papel importante na regulação da formação das MAs. Lynch, Brown (1997) sugerem que o etileno pode ajudar uma planta a distinguir um simbionte benéfico de um patogênico. Etileno é primariamente considerado como inibidor para formação de MA e este efeito tem sido demonstrado em várias combinações de fungo-hospedeiro. Azcón-Aguilar et al (1981) foram os primeiros a relatar colonização radicular por *Glomus mosseae* diminuída em dois hospedeiros, alfafa e trigo (*Triticum vulgare*), como resultado do tratamento do substrato com ethrel. Eles observaram que a intensidade da inibição da colonização aumenta de acordo com o aumento da concentração de ethrel no solo. Similarmente, Morandi (1989) relatou que uma aplicação semanal de ethrel no solo resulta em uma redução significativa da colonização das raízes de soja por *Glomus fasciculatum*. No entanto, existem vários problemas inerentes no uso de ethrel como fonte de etileno. Um dos mais importantes com respeito ao estudo de FMAs é a liberação de fosfato, o que pode reduzir a colonização (SMITH; READ, 1997). Para contornar esse problema, Ishii et al. (1996) aplicaram gás etileno diretamente ao substrato e observaram que a colonização de raízes de *Poncirus trifoliata* por *Gigaspora ramisporophora* reduziu com 1,0 µL etileno/L. Em raízes de ervilha colonizadas por *Glomus aggregatum*, a aplicação contínua de 5,5 µL de etileno/L similarmente reduz a colonização intrarradicular (GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001). O mesmo efeito foi observado em raízes de alho-porro

(*Allium porrum*) colonizadas por *G. aggregatum* e expostas a 0,6 μL de etileno/L (GEIL, GUINEL, 2002).

Evidências indiretas de participação do etileno na regulação de MAs existem. El Ghachtouli et al. (1995) sugeriram que a colonização de raízes de ervilha por *Glomus intraradices* aumenta depois do tratamento com poliaminas. Esse aumento pode ser causado, em parte, pelo efeito inibitório desses compostos na produção de etileno pelo hospedeiro. Também, Nadian et al. (1998) especularam que a colonização reduzida observada em raízes de *Trifolium subterraneum* (trevo) inoculadas com diferentes espécies de *Glomus* em solo altamente compactado, pode ter sido resultante da maior produção de etileno decorrente do impedimento físico ao crescimento das raízes. Em concentrações muito baixas (0,05 $\mu\text{L/L}$) etileno parece ter efeito estimulatório na formação micorrízica (ISHII et al. 1996).

Vários estudos indicam que a produção endógena de etileno pela planta hospedeira é alterada como resultado da formação da MAs. McArthur e Knowles (1992), usando raízes de batata micorrizadas com *G. fasciculatum* sob diferentes níveis de P, observaram alterações na produção de etileno induzidas por MA. Eles relatam que raízes colonizadas têm atividade reduzida da enzima ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC oxidase), que catalisa o último passo da via biossintética do etileno, em relação a raízes não colonizadas, limitando a capacidade das raízes micorrizadas produzirem etileno. Similarmente, Besmer e Koide (1999) relatam uma diminuição na produção de etileno em flores de plantas de *Antirrhinum majus* micorrizadas com *G. intraradices*. Diminuição na produção de etileno, devido à redução de afinidade de ACC oxidase, também foi observada em raízes de mamão inoculadas com *Gigaspora margarita* sob estresse hídrico (CRUZ; ISHII; KADOYA, 2000). Deste modo, parece existir relação entre a redução da produção de etileno pelo hospedeiro e o aumento da formação de MA, presumivelmente via inibição de ACC oxidase. Em contraste, Vierheilig et al. (1994) observaram que a produção de etileno não é alterada em raízes de tomate colonizadas por *Glomus mosseae*, em relação ao controle não-inoculado. Esses dados sugerem que a síntese de etileno na planta pode ser finamente regulada durante o processo de colonização das raízes por FMAs, e que pode

depende da interação dos genótipos do fungo e da planta, bem como as condições ambientais.

O papel do etileno no processo de formação de MAs não é conhecido. O etileno difundido através dos espaços intercelulares poderia agir como um sinal regulador da expressão de genes codificando enzimas envolvidas na degradação das paredes celulares da planta e do fungo, como glucanases e quitinases (KIRIACHEK et al., 2009). A relação entre o teor de etileno e a atividade de endocelulases foi analisada em mutantes simbióticos de ervilha inoculados com *G. mosseae* (MORALES-VELA et al., 2007). Os resultados mostraram que o aumento de atividade das endoglucanases e exoglucanases está associado à penetração da epiderme, ao crescimento da hifa através do córtex e da formação dos arbúsculos. Porém, a produção de etileno não apresentou alterações nas raízes micorrizadas dos diferentes mutantes analisados (MORALES-VELA et al., 2007). É possível que o conteúdo de etileno seja importante para manter a atividade basal das endocelulases, no entanto a relação entre o teor de etileno e o aumento da atividade das celulasas em raízes micorrizadas, quando comparadas com raízes não-micorrizadas, não foi demonstrada (MORALES-VELA et al., 2007).

A análise de mutantes de tomateiros superprodutor de etileno (*epinastic*) e outro insensível ao etileno (*Never ripe*), em uma mesma base genética (cv Micro-Tom), mostrou que eles apresentam menor taxa de colonização intrarradicar por *G. clarum* do que o genótipo selvagem, principalmente em baixa concentração de P (ZSÖGÖN et al., 2008). Nessa condição, o nível de transcritos que codificam uma quitinase básica (*Chi9*) é mais elevado nas raízes colonizadas dos mutantes *epinastic* e *Never ripe* do que o genótipo Micro-Tom, enquanto os níveis de transcritos de uma β -1,3-glucanase ácida classe III (*TomPR-Q'a*) é menor nas raízes colonizadas do mutante *epinastic* do que em Micro-Tom. Esses resultados sugerem que altas concentrações de etileno podem inibir a colonização, mas as baixas concentrações podem estimular o estabelecimento da simbiose, corroborando os resultados observados por Ishii et al. (1996) com a aplicação exógena de etileno.

1.1.3.2 Regulação por ácido abscísico (ABA)

Diferentemente do etileno, pouco se conhece sobre a relação entre ABA e o desenvolvimento de MAs. Diferentes estudos têm mostrado conteúdo aumentado de ABA nas folhas e raízes de *Zea mays* (DANNEBERG et al., 1992) e de raízes de *Glycine max* (MURAKAMI-MIZUKAMI et al., 1991; MEIXNER et al., 2005) micorrizadas comparadas com plantas não-micorrizadas. A produção de ABA também foi detectada nas hifas de FMAs em quantidades maiores do que nas raízes (ESCH et al., 1994).

Mutantes de tomateiro deficientes em ABA (*sitiens*) foram utilizados para determinar a função do ABA durante o estabelecimento da MA (HERRERA-MEDINA et al., 2007). Os mutantes *sitiens* apresentaram colonização intrarradicular por *G. intraradices* reduzida comparada com plantas selvagens. Além disso, observações microscópicas e quantificação de arbúsculos mostraram diferenças na morfologia do arbúsculo entre *sitiens* e a planta selvagem. Entretanto, é importante considerar que mutantes de tomateiro deficientes em ABA possuem teores elevados de etileno (SHARP et al., 2000). A aplicação de tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação do etileno, aumentou a taxa e a eficiência de colonização do controle e do mutante *sitiens* (HERRERA-MEDINA et al., 2007), porém não recuperou totalmente a capacidade de formação de MA em *sitiens*, mostrando que a deficiência em ABA também possui um efeito inibitório direto, além daquele mediado por etileno.

Dois mutantes deficientes em ABA, *sitiens* e *notabilis*, os quais produzem um conteúdo diferente de excesso de etileno, foram utilizados para determinar o papel do ABA no desenvolvimento da simbiose MA (RODRIGUEZ et al., 2010). Os resultados mostraram que o mutante *sitiens* teve uma grande redução na colonização fúngica o que correlaciona com sua incapacidade na biossíntese de ABA. Já o mutante *notabilis*, o qual manteve níveis normais de ABA nas raízes, foi menos afetado na formação de MA (RODRIGUEZ et al., 2010). Além disso, nas plantas selvagens foi observado redução da micorrização quando a formação de ABA foi bloqueada com a aplicação de tungstênio. Os autores sugerem que o acúmulo de etileno, como uma consequência da deficiência de ABA nos mutantes, afeta primariamente a intensidade micorrízica (RODRIGUEZ et al., 2010).

A análise do transcriptoma de tomateiro, comparando raízes micorrizadas da planta selvagem com plantas mutantes deficientes em ABA, demonstrou diferenças claras nas categorias funcionais do gene entre *sitiens* e seu controle selvagem colonizados por *G. intraradices* (GARRIDO et al., 2010). A micorrização da planta selvagem foi associada com ativação de genes relatados ao metabolismo de isoprenóide, enquanto a redução da formação da MA no mutante *sitiens* foi associada com indução de genes relatados a defesa e modificação da parede celular (GARRIDO et al., 2010). Dois desses genes (*Endo-Q* e *β -Exp*) também mostraram expressão induzida em resposta ao tratamento com ABA, etileno e MeJA e os autores sugerem que estes resultados refletem uma fina regulação da extensão da parede celular da planta em resposta ao crescimento do arbúsculo nos quais ácido jasmônico, ABA e etileno poderiam ser necessários para acomodação do arbúsculo na célula (GARRIDO et al., 2010). Devido às incertezas inerentes aos estudos utilizando hormônios e inibidores exógenos, uma abordagem promissora seria o uso de mutantes de tomateiro em um mesmo *background* genético para que duplos mutantes combinando baixa síntese de ABA (*sitiens*) e baixa sensibilidade ao etileno (*Never ripe*) ou superprodutor de etileno (*epinastic*) pudessem ser construídos e sua capacidade de formar MAs avaliada.

1.1.3.3 Regulação pelo sistema de defesa vegetal

Aumentos transitórios seguidos da supressão das atividades e, ou, nível de transcritos de quitinases e β -1,3-glucanases têm sido observados em raízes micorrizadas (SPANU et al., 1989; LAMBAIS; MEHDY, 1993,1998; VIERHEILIG et al., 1994). Além disso, a regulação dessas hidrolases é dependente do teor de P no substrato de cultivo (LAMBAIS; MEHDY, 1995). No modelo proposto por Lambais e Mehdy (1995), isoformas particulares de β -1,3-glucanase induzidas com baixo teor de P poderiam contribuir para a colonização das raízes por meio da hidrólise parcial da parede celular vegetal, facilitando a penetração do fungo. Em contraste, isoformas de quitinases induzidas localmente com alto teor de P regulariam negativamente o crescimento fúngico nas raízes, por meio da degradação controlada da parede celular fúngica. O processo de regulação da expressão desses genes de defesa em MAs ainda

é pouco conhecido, mas é provável que envolva a regulação do estresse oxidativo (LAMBAIS, 2000).

O estresse oxidativo é caracterizado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) que podem causar uma oxidação rápida e deletéria da maioria dos componentes celulares (APEL; HIRT, 2004). Como consequência, as plantas desenvolveram um eficiente e dinâmico sistema de remoção de EROs, que consiste principalmente de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalases (CAT) e ácido ascórbico (ASADA, 2006).

Evidências do envolvimento de EROs na regulação de MA foram encontradas com a análise de atividade de enzimas antioxidantes em raízes micorrizadas. Aumentos transitórios de CAT e APX foram observados em raízes micorrizadas de *Nicotiana tabacum*, o que coincidiu com o estágio de formação do apressório na superfície da raiz (BLILOU et al. 2000). Altos níveis de atividade de SOD foram observados em raízes de alface colonizadas por *Glomus mosseae* ou *Glomus deserticola*, comparadas ao controle não-micorrizado, em condições de estresse hídrico (RUIZ-LOZANO; AZCÓN; PALMA, 1996) e esta resposta foi confirmada a nível transcricional por subseqüentes análises moleculares (RUIZ-LOZANO et al., 2001). Atividade aumentada de enzimas antioxidantes em três espécies de arbustos inoculados com *Glomus claroideum* em um solo semi-árido degradado também foi observada por Alguacil et al. (2003). Estes autores sugerem que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes poderia estar associado, pelo menos em parte, aos efeitos benéficos da micorrização sobre o desempenho de espécies arbustivas cultivadas sob condições semi-áridas do Mediterrâneo (ALGUACIL et al., 2003). Mudas de *Glycine max* micorrizadas por *Glomus etunicatum* na presença de NaCl apresentaram atividade aumentada de enzimas antioxidantes e é sugerido que a presença da simbiose MA auxiliam na proteção contra o estresse oxidativo causado pelo NaCl (GHORBANLI; EBRAHIMZADEH; SHARIFI, 2004). Além disso, a colonização micorrízica por *G. mosseae* pode proteger mudas de *Poncirus trifoliata* contra o dano oxidativo causado por estresse hídrico, aumentando a tolerância contra a seca (WU; XIA; ZOU, 2006).

Existem evidências que as atividades de enzimas antioxidantes podem ser reguladas pelo P. Em raízes micorrizadas por *G. fasciculatum* de *Zizyphus joazeiro*, foram observados aumentos das atividades de peroxidases em resposta ao incremento de P disponível para as plantas e indução de isoformas de peroxidases e polifenol oxidase em resposta à inoculação (MATHUR; VYAS, 1995). Baixa atividade de peroxidases em baixo teor de P e indução da atividade em alto teor de P foram observadas em raízes de batata (McARTHUR; KNOWLES, 1992). Lambais, Rios-Ruiz e Andrade (2003) observaram que a atividade da CAT aumenta em raízes micorrizadas quando comparada com raízes não-micorrizadas. Em condições de alta concentração de P, essa indução é atenuada, sugerindo que CAT pode participar da regulação do crescimento intrarradicular do fungo e do desenvolvimento das MAs. Além disso, em condições de baixa concentração de P, uma indução transiente da atividade de guaiacol peroxidase (GPX) seguida de supressão foi observada. No entanto, em alta concentração de P, a supressão da atividade de GPX é atenuada nas raízes colonizadas por *Glomus clarum*, quando comparada àquela observada em baixas concentrações de P, sugerindo que a concentração de P na planta é determinante na modulação da atividade das peroxidases (LAMBAIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003).

1.1.4 Micro-Tom como modelo vegetal para estudo da simbiose

O principal modelo vegetal para o estudo de diversos processos fisiológicos é *Arabidopsis thaliana*. Além de possuir um genoma reduzido, os estudos com *Arabidopsis* são facilitados por seu ciclo de vida curto e seu tamanho reduzido (SOMERVILLE; MEYEROWITZ, 2002). Porém, assim como todos os membros da família Brassicaceae, *Arabidopsis* não forma simbiose com FMAs.

O tomateiro tem sido utilizado como alternativa a *Arabidopsis*, pois possui um genoma de aproximadamente 950 Mb, mapas cromossômicos bem estruturados com marcadores clássicos e moleculares (RICK; YODER, 1988; TANKSLEY et al., 1992) e uma ampla riqueza de germoplasma constituída por 9 espécies selvagens de *Lycopersicon* que podem ser cruzadas com o tomateiro cultivado (STEVENS; RICK, 1986). Além da possibilidade da introgressão de diversas características vindas de

espécies selvagens (PINO et al., 2010), existem inúmeros mutantes monogênicos de tomateiro com alterações em diversas rotas metabólicas e de desenvolvimento (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). Entre várias mutações já descritas em tomateiro, encontram-se mutantes com alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios (ZSÖGÖN et al., 2008).

As principais limitações para a utilização intensiva do tomateiro como modelo em abordagens genéticas relacionadas a diversas questões fisiológicas são seu tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em desvantagem quando comparados aos de *Arabidopsis*. Desse modo, a cultivar miniatura de tomateiro (Micro-Tom), proposta por Meissner et al. (1997) como modelo para estudos genéticos, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 mL de substrato, completando seu ciclo em 70-90 dias. Essa cultivar vem ganhando espaço em estudos genéticos e fisiológicos (DAN et al., 2006; LIMA et al., 2004; ZSÖGÖN et al., 2008), tendo, inclusive, bancos de EST desenvolvidos exclusivamente para ela no Kazuza Institute no Japão (YANO et al., 2006). Com essas características, a cultivar Micro-Tom pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (PINO et al., 2010), o que faz dele um ótimo modelo para estudos com MAs.

Referências

AHONEN-JONNARTH, U.; GÖRANSSON, A.; FINLAY, R.D. Growth and nutrient uptake of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedling treated with elevated Al concentrations.

Tree Physiology, Victoria, v. 23, n. 3, p. 157-167, 2003.

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, n. 7043, p. 824-827, 2005.

ALGUACL, M.M.; HERNÁNDEZ, J.A.; CARAVACA, F.; PORTILLO, B.; ROLDÁN, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 118, p. 562-570, 2003.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 391-396, 2006.

AZCÓN-AGUILAR, C.; RODRIGUES-NAVARRO, D.N.; BAREA, J.M. Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in Medicago and Triticum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 461-468, 1981.

BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 949-957, 2000.

BALESTRINI, R.; BERTA, G.; BONFANTE, P. The plant nucleus in mycorrhizal roots - positional and structural modifications. **Biology of the Cell**, Paris, v.75, n. 3, p. 235-243, 1992.

BÉCARD, G.; PICHÉ, Y. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, New York, v. 112, n. 1, p. 77-83, 1989.

BESMER, Y.L.; KOIDE, R.T. Effect of mycorrhizal colonization and phosphorus on ethylene production by snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) flowers. **Mycorrhiza**, New York, v. 9, n. 3, p. 161-166, 1999.

BESSERER, A.; PUECH-PAGES, V.; KIEFER, P.; GOMEZ-ROLDAN, V.; JAUNEAU, A.; ROY, S.; PORTAIS, J.C.; ROUX, C.; BECARD, G.; SEJALON-DELMAS, N. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. **Plos Biology**, San Francisco, v. 4, n. 7, p. 1239-1247, 2006.

BLANCAFLOR, E.B.; ZHAO, L.M.; HARRISON, M.J. Microtubule organization in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. **Protoplasma**, Vienna, v.217, n. 4, p. 154-165, 2001.

BLILOU, I.; BUENO, P.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. **Mycological Research**, New York, v. 194, n. 6, p. 722-725, 2000.

BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, New York, v.130, n. 2, p.3-21, 1995.

CHABAUD, M.; VENARD, C.; DEFAUX-PETRAS, A.; BÉCARD, G.; BARKER, D.G. Targeted inoculation of *Medicago truncatula* *in vitro* root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxon, v. 156, n. 2, p.265- 273, 2002.

CRUZ, A.F. ISHII, T.; KADOYA, K. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential, and levels of 1-aminocyclopropane-1carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress conditions. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, n. 3, p. 121-123, 2000.

DAN, Y.H.; YAN, H.; MUNYIKWA, T.; DONG, J.; ZHANG, Y.L.; ARMSTRONG, C.L. MicroTom – a high-throughput model transformation system for functional genomics. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 5, p. 432-441, 2006.

DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea-mays* L). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 141, n. 1, p. 33-39, 1993.

EL GHACHTOULI, N.; PAYNOT, M.; MORANDI, D.; MARTIN-TANGUY, J.; GIANINAZZI, S. The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wild-type *Pisum sativum*, cv. Frisson (nod⁺ myc⁺) and two mutants (nod⁻myc⁺ and nod⁻myc⁻). **Mycorrhiza**, New York, v. 5, n. 3, p. 189-192, 1995.

ENDRE, G.; KERESZT, A.; KEVEI, Z.; MIHACEA, S.; KALO, P.; KISS, G.B. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 962-966, 2002.

ESCH, H.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Demonstration of abscisic-acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Plant Science**, Clare, v. 99, n. 1, p. 9-16, 1994.

FINLAY, R.D. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 1115-1126, 2008.

FITTER, A.H. Darkness visible: reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, Oxon, v. 93, n. 2, p. 231-243, 2005.

GADKAR, V.; DAVID-SCHWARTZ, R.; KUNIK, T.; KAPULNIK, J. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. **Plant Physiology**, Rockville, n. 127, n. 4, 1493-1499, 2001.

GARRIDO, J.M.G.; MORCILLO, R.J.L.; RODRIGUEZ, J.A.M.; BOLE, J.A.O. Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 23, n. 5, p. 651-664, 2010.

GEIL, R.D.; GUINEL, F.C. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 2, p. 114-119, 2002.

GEIL, R.D.; PETERSON, R.L.; GUINEL, F.C. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n. 3, p. 137-143, 2001.

GENRE, A.; BONFANTE, P. A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. **Protoplasma**, Vienna, v.199, n. 1-2, p. 30-38, 1997.

GENRE, A.; BONFANTE, P. Epidermal cells of a symbiosis defective mutant of *Lotus japonicus* show altered cytoskeleton organization in the presence of a mycorrhizal fungus. **Protoplasma**, Vienna, v. 219, n. 1-2, p. 43-50, 2002.

GENRE, A., CHABAUD, M., TIMMERS, T., BONFANTE, P.; BARKER, D. G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 12, p. 3489–3499, 2005.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; FACCIO, A.; BARKER, D. G.; BONFANTE, P. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. **Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 5, p. 1407-1420, 2008.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRECHENMACHER, L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic cell programme. **Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique**, Ontario, v. 82, n. 8, p. 1228-1234, 2004.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRANZANTI, B.; GIANINAZZI, S. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. **Symbiosis**, Rehovot, v. 7, n. 3, p. 243-255, 1989.

GHORBANLI, M.; EBRAHIMZADEH, H.; SHARIFI, M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 48, p. 575-581, 2004.

HARRISON, M.J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 361-389, 1999.

HARRISON, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 19-42, 2005.

HERRERA-MEDINA, M.J.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H.; BOTE, J.A.O.; GARRIDO, J.M.G. Absciscic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, Oxon, v. 175, n. 3, p. 554-564, 2007

HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 139-146, 2007.

HILDEBRANDT, U.; OUZIAD, F.; MARNER, F. J.; BOTHE, H. The bacterium *Paenibacillus validus* stimulates growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* up to the formation of fertile spores. **FEMS Microbiology Letter**, Oxon, v. 254, n. 2, p. 258–267, 2006.

IMAIZUMI-ANRAKU, H.; TAKEDA, N.; CHARPENTIER, M.; PERRY, J.; MIWA, H.; UMEHARA, Y.; KOUCHI, H.; MURAKAMI, Y.; MULDER, L.; VICKERS, K.; PIKE, J.; DOWNIE, J.A.; WANG, T.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; TABATA, S.; YOSHIKAWA, M.; MUROOKA, Y.; WU, G. J.; KAWAGUCHI, M.; KAWASAKI, S.; PARNISKE, M.; HAYASHI, M. Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. **Nature**, London, v. 433, n. 7025, p. 527-531, 2005.

ISHII, T.; SHRESTHA, Y.H.; MATSUMOTO, I.; KADOYA, K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 65, n. 3, p. 525-529, 1996.

JAVOT, H.; PUMPLIN, N.; HARRISON, M.J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v.30, n. 3, p. 310-322, 2007.

JOURNET, E.P.; EL-GACHTOULI, N.; VERNOUD, V.; BILLY, F.; PICHON, M.; DEDIEU, A.; ARNOULD, C.; MORANDI, D.; BARKER, D.G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v. 14, n. 6, p. 737-748, 2001.

KANAMORI, N.; MADSEN, L.H.; RADUTOIU, S.; FRANTESCU, M.; QUISTGAARD, E.M.H.; MIWA, H.; DOWNIE, J.A.; JAMES, E.K.; FELLE, H.H.; HAANING, L.L.; JENSEN, T.H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 103, n. 2, p. 359-364, 2006.

KIRIACHEK, S.G.; DE AZEVEDO, L.C.B.; PERES, L.E.P.; LAMBAIS, M.R. Regulation of arbuscular mycorrhizae development. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.

KISTNER, C.; WINZER, T.; PITZSCHKE, A.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; WEBB, K.J.; SZCZYGLOWSKI, K.; PARNISKE, M. Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2217–2229, 2005.

KOSUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D.G.; BECARD, G. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 952-962, 2003.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. (Ed.). **Current advances in mycorrhiza research**, St. Paul: APS Press, 2000. p. 45-59.

LAMBAIS, M.R. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 405-413, 2006.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 6, n. 1, p. 75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p.S533-S540, 1995.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, New York, v. 140, n. 1, p. 33-42, 1998.

LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxon, v. 160, n. 2, p. 421-428, 2003.

LEVY, J.; BRES, C.; GEURTS, R.; CHALHOUB, B.; KULIKOVA, O.; DUC, G.; JOURNET, E. P.; ANE, J.M.; LAUBER, E.; BISSELING, T.; DENAIRE, J.; ROSENBERG, C.; DEBELLE, F. A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. **Science**, Washington, v. 303, n. 5662, p. 1361-1364, 2004.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; NETO, A.T.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Clare, v. 167, n. 4, p. 753-757, 2004.

LYNCH, J.; BROWN, K.M. Ethylene and plant responses to nutritional stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 3, p. 613-619, 1997.

LINGUA, G.; FUSCONI, A.; BERTA, G. The nucleus of differentiated root plant cells: modifications induced by arbuscular mycorrhizal fungi. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v.45, n.1, p.9-20, 2001.

LIU, J.Y.; BLAYLOCK, L.A.; ENDRE, G.; CHO, J.; TOWN, C.D.; VANDENBOSCH, K.A.; HARRISON, M.J. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 9, p. 2106-2123, 2003.

LOHSE, S.; SCHLIEMANN, W.; AMMER, C.; KOPKA, J.; STRACK, D.; FESTER, T. Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v.139, n. 1, p. 329-340, 2005.

MADSEN, E.B.; MADSEN, L.H.; RADUTOIU, S.; OLBRYT, M.; RAKWALSKA, M.; SZCZYGLOWSKI, K.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. **Nature**, London, v. 425, n. 6958, p. 637-640, 2003.

MARTIN-LAURENT, F.; VANTUINEN, D.; DUMASGAUDOT, E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S.; FRANKEN, P. Differential display analysis of RNA accumulation in arbuscular mycorrhiza of pea and isolation of a novel symbiosis-regulated plant gene. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 256, n. 1, p. 37-44, 1997.

MARULANDA, A.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. **Physiologia Plantarum**, Granada, v. 119, n. 4, p. 526-533, 2003.

MATHUR, N.; VYAS, A. Changes in nitrate reductase and glutamine synthetase activities in *Ziziphus mauritiana* by different VAM fungi. **Current Science**, Bangalore, v. 68, n. 11, p. 1144-1146, 1995.

MATUSOVA, R.; RANI, K.; VERSTAPPEN, F.W.A.; FRANSSEN, M.C.R.; BEALE, M.H.; BOUWMEESTER, H.J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, p. 920-934, 2005.

McARTHUR, D.A.J.; KNOWLES, N.R. Resistance responses of potato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorus levels. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 341-351, 1992.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxon, v. 12, p. 1465-1471, 1997.

MEIXNER, C.; LUDWIG-MULLER, J.; MIERSCH, O.; GRESSHOFF, P.; STAEHELIN, C.; VIERHEILIG, H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. **Planta**, New York, v. 222, n. 4, p. 709-715, 2005.

MILLER, R.M.; REINHARDT, D.R.; JASTROW, J.D. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. **Oecologia**, New York, v. 103, n. 1, p. 17-23, 1995.

MITRA, R.M.; SHAW, S.L.; LONG, S.R. Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume–rhizobia symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 27, p. 10217-10222, 2004.

MORALES-VELA, G.; MOLINERO-ROSALES, N.; OCAMPO, J.A.; GARCÍA-GARRIDO, J.M. Endocellulase activity is associated with arbuscular mycorrhizal spread in pea symbiotic mutants but not with its ethylene content in root. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 786-792, 2007.

MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 27, n. 5, p. 697-701, 1989.

MURAKAMI-MIZUKAMI, Y.; YAMAMOTO, Y.; YAMAKI S. Analyses of indole acetic-acid and abscisic-acid contents in nodules of soybean plants bearing VA mycorrhizas. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 291-298, 1991.

NADIAN, H.; SMITH, S.E.; ALSTON, A.M.; MURRAY, R.S.; SIEBERT, B.D. Effects of soil compaction on phosphorus uptake and growth of *Trifolium subterraneum* colonized by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 140, n. 1, p. 155-165, 1998.

NAIR, M.G.; SAFIR, G. R.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 434-439, 1991.

OLDROYD, G.E.D.; DOWNIE, J.A. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, n. 7, p. 566-576, 2004.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews**, London, v. 6, p. 763-775, 2008.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, n. 23, 2010.

PIROZYNSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **Biosystems**, Clare, v. 6, n. 3, p. 153-164, 1975.

PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1743-1750, 2004.

RADUTOIU, S.; MADSEN, L.H.; MADSEN, E.B.; FELLE, H.H.; UMEHARA, Y.; GRØNLUND, M.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. **Nature**, London, v. 425, n. 6958, p. 585- 592, 2003.

REMY, W.; TAYLOR, T.M.; HASS, H.; KERP, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 25, p. 11841-11843, 1994.

REQUENA, N.; MANN, P.; HAMPP, R.; FRANKEN, P. Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: GmGIN1, a novel gene encoding a protein with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 244, n. 1/2, p. 129-139, 2002.

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

RIELY, B.K.; LOUGNON, G.; ANÉ, J.M.; COOK, D.R. The symbiotic ion channel homolog DMI1 is localized in the nuclear membrane of *Medicago truncatula* roots. **Plant Journal**, Oxon, v. 49, n. 2, p. 208-216, 2007.

RODRIGUEZ, J.A.M.; MORCILLO, R.L.; VIERHEILIG, H.; OCAMPO, J.A.; LUDWIG-MULLER, J.; GARRIDO, J.M.G. Mycorrhization of the notabilis and sitiens tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, n. 8, p. 606-613, 2010.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCÓN, R.; PALMA, J.M. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. **New Phytologist**, New York, v. 134, p. 327–333, 1996.

RUIZ-LOZANO, J.M.; COLLADOS, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, New York, v. 151, p. 493-502, 2001.

SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1575-1584, 2000.

SICILIANO, V.; GENRE, A.; BALESTRINI, R.; CAPPELLAZZO, G.; deWIT, P.J.G.M.; BONFANTE, P. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 3, p. 1455–1466, 2007.

SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, London, v. 363, n. 6424, p. 67-69, 1993.

SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis** 2nd ed. London: Academic Press, 1997. 456 p.

SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. Amsterdam: Academic Press, 2008. 769 p.

SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (Ed). **The Arabidopsis Book**, Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002. 320 p.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A.; BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, New York, v. 177, p. 447-455, 1989.

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

STRACHE, S.; KISTNER, C.; YOSHIDA, S.; MULDER, L.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA S.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J.; SZCZYGLOWSKI, K.; PARNISKE, M. A plant receptor kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 959-962, 2002.

TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; DEVICENTE, M.C.; BONIERBALE, M.W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RODER, M.S.; WING, R.A.; WU, W.; YOUNG, N.D. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Baltimore, v. 132, n. 4, p. 1141-1160, 1992.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; MOHR, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and beta-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 143, n. 3, p. 337-343, 1994.

YANO, K.; WATANABE, M.; YAMAMOTO, N.; MAEDA, F.; TSUGANE, T.; SHIBATA, D. MiBASE: a database of a miniature tomato cultivar Micro-Tom. **Plant Biotechnology**, Tokyo, v. 23, p. 195-198, 2006.

YONEYAMA, K.; TAKEUCHI, Y.; YOKOTA, T. Production of clover broomrape seed germination stimulants by red clover root requires nitrate but is inhibited by phosphate and ammonium. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n.1, p. 25-30, 2001.

YOSHIDA, S.; PARNISKE, M. Regulation of plant symbiosis receptor kinase through serine and threonine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 10, p. 9203-9209, 2005.

WU, Q.S.; XIA, R.X.; ZOU, Y.N. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, p. 1101-1110, 2006.

ZSÖGÖN A., LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259-267, 2008.

2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA DE DEFESA VEGETAL EM MUTANTES DE TOMATEIRO *epinastic* E *Never ripe* COLONIZADOS POR *Glomus clarum*

Resumo

Existem evidências que o hormônio vegetal etileno, que exerce várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, possa desempenhar uma importante função na regulação do desenvolvimento das micorrizas arbusculares (MAs), porém o seu papel na simbiose MA ainda não é bem esclarecido. Sabendo-se que enzimas relacionadas ao sistema de defesa vegetal são induzidas em plantas micorrizadas, é possível que o etileno participe da regulação destas enzimas. Para tanto, plantas mutantes da cultivar Micro-Tom (MT), superprodutor de etileno (*epinastic* – *epi*) e parcialmente insensível ao etileno (*Never ripe* – *Nr*) foram inoculadas com *Glomus clarum* e avaliadas aos 16, 23, 30 e 37 dias após inoculação (DAI). A expressão diferencial dos genes codificando uma β -1,3-glucanase básica (*GlucB*), quitinases ácida (*Chi3*) e básica (*Chi9*), superóxido dismutase (*CuZnSOD*), catalase (*CAT*) e peroxidase (*TPX1*) foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. A colonização micorrízica no mutante *epi* foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que MT e o mutante *Nr*. Além disso, a expressão do gene *LePT4* específico da simbiose, foi fortemente reduzida em *epi* quando comparada ao MT. Já para o mutante *Nr* não foram observadas alterações no padrão de colonização e funcionalidade da simbiose em relação ao MT. Indução no acúmulo de transcritos do gene *Chi3* foi maior em raízes micorrizadas de *epi* em relação aos demais genótipos micorrizados para todas as épocas avaliadas, principalmente aos 16 e 23 DAI. Já o gene *Chi9* apresentou acúmulo de transcritos somente aos 16 DAI, em que a indução em raízes de *epi* micorrizadas chegou a ser 2 vezes maior do que MT. A indução no acúmulo de transcritos de *GlucB* foi induzida em todos os genótipos aos 16 e 23 DAI, entretanto o mutante *Nr* foi o genótipo mais fortemente induzido chegando a ser 29 e 9 vezes maior do que MT e *epi*, respectivamente. Um padrão semelhante no perfil da expressão dos genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foi observado. Contudo, *CuZnSOD* foi o gene que apresentou uma forte indução no acúmulo de transcritos em relação a *TPX1* e *CAT*. O mutante *epi* apresentou um acúmulo de transcritos 5 vezes maior tanto para o seu controle não-inoculado quanto para o controle selvagem MT micorrizado. É possível que o etileno module o sistema de defesa vegetal durante o desenvolvimento da simbiose MA, permitindo o estabelecimento e funcionalidade da simbiose.

Palavras-chave: Micro-Tom; Micorriza arbuscular; Etileno; Genes de defesa vegetal; Estresse oxidativo

Abstract

There is evidence that the plant hormone ethylene, which has several functions in plant growth and development, can play an important role in regulating development of arbuscular mycorrhizae (AM), but its role in symbiosis AM is not understood yet. It is possible that ethylene plays a role in regulating enzymes related to the plant defense system induced in mycorrhizal plants. Thus, mutant plants of the cultivar Micro-Tom (MT), ethylene overproducer (*epinastic* - *epi*) and partially insensitive to ethylene (*Never ripe* - *Nr*) were inoculated with *Glomus clarum* and evaluated at 16, 23, 30 and 37 days after inoculation (DAI). The differential expression of genes encoding a β -1,3-glucanase basic (*GlucB*), acidic chitinase (*Chi3*) and basic (*Chi9*), superoxide dismutase (*CuZnSOD*), catalase (*CAT*) and peroxidase (*TPX1*) was assessed by real time quantitative PCR. Intraradical colonization in *epi* mutant was significantly lower ($p < 0.05$) than that in MT and in the mutant *Nr*. Furthermore the gene expression *LePT4* specific symbiosis was strongly reduced when compared to *epi* in MT. However no changes were observed in the pattern of colonization and functionality of the symbiosis for the *Nr* mutant when compared to MT. Induction in the transcripts accumulation of genes *Chi3* was higher in mycorrhizal roots of *epi* in comparison with other genotypes inoculated for all periods, especially at 16 and 23 DAI. The gene *Chi9* showed transcripts accumulation only at 16 DAI, when the induction of roots in mycorrhizal *epi* reached levels twice as high as that in the MT. The induction in the transcripts accumulation of *GlucB* gene expression was induced in all genotypes at 16 and 23 DAI, however, the *Nr* mutant genotype was more strongly induced amounting, respectively, 29 and 9 times higher than that in MT and *epi*. A similar pattern in the expression profile of genes that encode enzymes related to oxidative stress was observed. However, *CuZnSOD* was the gene that showed a strong induction in the accumulation of transcripts for *TPX1* and *CAT*. The *epi* mutant showed a 5-fold superiority for the transcripts accumulation for both its nonmycorrhizal control and wild MT mycorrhizal control. It is likely that ethylene modulates the plant defense system during the development of symbiosis MA allowing the establishment and functionality of the symbiosis.

Keywords: Micro-Tom; Mycorrhiza; Ethylene; Plant defense genes; Oxidative stress

2.1 Introdução

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pertencem à divisão Glomeromycota, ordem Glomerales (SCHUSSLER; SCHWARZOTT; WALKER, 2001) e podem formar associações com mais de 80% de espécies vegetais (SMITH; READ, 2008). A simbiose resultante é conhecida como micorriza arbuscular (MA) e é amplamente distribuída em todo o mundo. Tem sido estimado que essa associação surgiu há mais de 400 milhões de anos e foi fundamental na evolução de plantas terrestres (SMITH; READ, 2008). FMAs são biotróficos obrigatórios que colonizam o córtex da raiz da planta hospedeira inter- e intracelularmente, formando estruturas especializadas e altamente ramificadas denominadas arbúsculos (PARNISKE, 2008). O fungo obtém carboidratos da planta hospedeira e, em contrapartida, auxiliam a planta na aquisição de nutrientes minerais (principalmente fósforo) e água. A simbiose é mantida durante toda a vida da planta, afetando significativamente sua fisiologia (PARNISKE, 2008).

Os papéis dos fitormônios no controle do desenvolvimento de MAs merecem especial atenção, já que eles são importantes na comunicação entre plantas e microrganismos, e podem exercer importantes papéis regulatórios. Existem evidências que o etileno, um fitormônio gasoso com várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, pode ter uma importante função na regulação da formação da MA. O efeito inibitório do etileno na formação de MAs tem sido demonstrado em várias combinações hospedeiro-FMA (AZCÓN-AGUILAR; RODRIGUES-NAVARRO; BAREA, 1981; MORANDI, 1989; GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001; GEIL; GUINEL, 2002), porém dependendo da concentração de etileno, este hormônio, pode tanto inibir quanto estimular a formação da MA (ISHII et al., 1996).

Aumentos transitórios seguidos da supressão das atividades e, ou, nível de transcritos de quitinases e β -1,3-glucanases têm sido observados em raízes micorrizadas (SPANU et al., 1989; LAMBAIS; MEHDY, 1993; VIERHEILIG et al., 1994; LAMBAIS; MEHDY, 1998). O processo de regulação da expressão desses genes de defesa em MAs ainda é pouco conhecido, mas é provável que dependa do estado redox das células (RUIZ-LOZANO, 2003; LAMBAIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003;

WU; XIA; ZOU, 2006). O estado redox nas células é controlado pelo metabolismo de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) que podem causar uma oxidação rápida e deletéria da maioria dos componentes celulares (APEL; HIRT, 2004). Como consequência, as plantas desenvolveram um eficiente e dinâmico sistema de remoção de EROs, que consiste principalmente de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalases (CAT) e ácido ascórbico (ASADA, 2006).

A indução transiente de enzimas antioxidantes tem sido observada em raízes micorrizadas. Altos níveis de atividade de SOD foram observados em raízes de alface colonizadas por *Glomus mosseae* ou *Glomus deserticola*, comparadas ao controle não-micorrizado, em condições de estresse hídrico (RUIZ-LOZANO; AZCÓN; PALMA, 1996) e esta resposta foi confirmada a nível transcricional por subseqüentes análises moleculares (RUIZ-LOZANO et al., 2001). Além disso, vários trabalhos já demonstraram indução da atividade de guaiacol peroxidase (G-POD), CAT, APX e glutathione redutase (GR) em raízes micorrizadas em diferentes condições. Lambais, Rios-Ruiz e Andrade (2003) observaram que a atividade da catalase aumenta em raízes micorrizadas quando comparada com raízes não-micorrizadas. Em condições de alta concentração de fosfato (P), essa indução é atenuada, sugerindo que as catalases podem participar da regulação do crescimento intrarradicular do fungo e do desenvolvimento das MAs. Além disso, estes autores observaram que em condições de baixa concentração de P, uma indução transiente da atividade da guaiacol peroxidase (GPX) seguida de supressão foi observada. No entanto, em alta concentração de P, a supressão da atividade GPX é atenuada nas raízes colonizadas por *G. clarum*, quando comparada àquela observada em baixas concentrações de P, sugerindo que a concentração de P na planta é determinante na modulação da atividade das peroxidases (LAMBALIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003). Atividade aumentada de enzimas antioxidantes em três espécies de arbustos inoculados com *Glomus claroideum* em um solo semi-árido degradado também foi observada por Alguacil et al. (2003). Estes autores sugerem que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes poderia estar associado, pelo menos em parte, aos efeitos benéficos da micorrização sobre o desempenho de espécies

arbustivas cultivadas sob condições semi-áridas do Mediterrâneo (ALGUACIL et al., 2003). Mudanças de *Glycine max* micorrizadas por *Glomus etunicatum* na presença de NaCl apresentaram atividade aumentada de enzimas antioxidantes e é sugerido que a presença da simbiose MA auxilia na proteção contra o estresse oxidativo causado pelo NaCl (GHORBANLI; EBRAHIMZADEH; SHARIFI, 2004). Além disso, a colonização micorrízica por *Glomus mosseae* pode proteger mudas de *Poncirus trifoliata* contra o dano oxidativo causado por estresse hídrico, aumentando a tolerância contra a seca (WU; XIA; ZOU, 2006).

Enquanto o sistema de defesa vegetal tem sido estudado em diferentes associações planta-FMA e em condições ambientais adversas, é de fundamental importância estudar o envolvimento do etileno na regulação de enzimas relacionadas à defesa em plantas micorrizadas, já que a sinalização por EROs pode envolver este hormônio (GLAZEBOOK, 2005). O objetivo deste trabalho é avaliar o desenvolvimento de MA em mutantes hormonais de tomateiro da cultivar Micro-Tom superprodutor de etileno (*epinastic*) e parcialmente insensível ao etileno (*Never ripe*) e a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao sistema de defesa vegetal em suas raízes.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Material vegetal e Fungo Micorrízico Arbuscular

Mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn *Solanum lycopersicum* L.) com baixa sensibilidade ao etileno (*Never ripe*, WIKINSON et al., 1995) e superprodutor de etileno (*epinastic*, BARRY et al., 2001) foram obtidos do “Tomato Genetic Research Center” (Universidade da Califórnia, Davis) e introgrididos no modelo genético Micro-Tom (MT), obtidos de “Weizmann Institute of Science” (Israel). A introgressão das mutações em MT foi realizada como descrito por Pino et al. (2010).

Glomus clarum foi multiplicado em associação com raízes de *Brachiaria decumbens* em vasos contendo areia e vermiculita como substrato, em condições de casa-de-vegetação.

2.2.1.2 Instalação dos experimentos e condições de crescimento

Sementes de MT e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) foram semeadas em bandejas de isopor® contendo substrato esterilizado composto por areia lavada e vermiculita (2:1, v/v).

Plântulas que apresentavam três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos plásticos contendo 400 g do substrato e adubadas com: 240 mg N kg⁻¹ (dividido em três aplicações a cada 10 dias, na forma de NH₄NO₃), 270 mg K kg⁻¹ (na forma de KCl), 120 mg Ca kg⁻¹ (na forma de CaCl₂.2H₂O), 60 mg Mg kg⁻¹ (na forma de MgSO₄.7H₂O), 1 mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1 mL de solução de micronutrientes de Hoagland por vaso (SARRUGE, 1975). A adubação fosfatada foi feita com 10 mg P kg⁻¹ substrato (na forma de KH₂PO₄). Uma vez por semana, as plantas foram suplementadas com solução de Hoagland sem P.

A inoculação com o fungo micorrízico *G. clarum* foi realizada no momento do transplantio. O inóculo (aproximadamente 10 mL) era constituído de uma mistura de

solo, esporos fúngicos e fragmentos de hifas e raízes de *Brachiaria decumbens* colonizadas, obtidas de vasos de multiplicação. Tratamentos controle não-micorrizados foram inoculados com uma mistura de solo e raízes de *B. decumbens* não-micorrizadas (10 mL).

Os tratamentos foram arranjados em blocos casualizados, com 6 repetições por tratamento. O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação, com temperatura média de 28 °C e umidade relativa de 50%.

As avaliações foram feitas 16, 23, 30 e 37 dias após a inoculação (Figura 2.1). As raízes foram lavadas em água corrente e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente. Foram retirados pequenos fragmentos ao longo de toda a raiz para avaliação da colonização intrarradicular. As raízes restantes foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para as análises moleculares.

2.2.1.3 Avaliação da colonização micorrízica

As raízes foram tratadas com solução de KOH 10% a 90 °C por 30 min e transferidas para uma solução 5% de tinta QuInk (Parker) diluída em solução de ácido acético 5% a 90 °C durante 3 min, lavadas em ácido acético 5% e armazenadas em lactoglicerol (VIERHEILIG et al., 1998).

A taxa de colonização foi determinada pela presença de estruturas fúngicas no tecido cortical, utilizando-se um microscópio estereoscópico (aumento de 72 vezes) e placas reticuladas, de acordo com Giovanetti e Mosse (1980).

A presença de arbúsculos, vesículas e hifas no interior das raízes e de apressórios foi determinada após análise por microscopia de contraste de fase utilizando um microscópio Eclipse E800 (Nikon, Japan) acoplado a uma câmera digital Exwave HAD (Sony, Japan). A quantificação das estruturas fúngicas (arbúsculo, vesícula, hifa externa e apressório) foi feita segundo o método ampliado de interseções (McGONIGLE et al., 1990). Para cada uma das seis repetições de cada tratamento foram preparadas duas lâminas, cada uma contendo 10 fragmentos de raiz de aproximadamente 1 cm. Para cada fragmento foi examinado cinco diferentes pontos de interseção, totalizando 100 leituras para cada repetição biológica. Para cada ponto,

verificou-se a presença das estruturas fúngicas e o percentual de incidência de cada estrutura foi calculado pelo total de pontos.

Figura 2.1 – Material vegetal utilizado no presente trabalho. DAI – dias após inoculação.

2.2.1.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados através do programa Sisvar Versão 5.1. Para normalização, os dados foram transformados para $\arcsin(x+1)^{0,5}$. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2.1.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para obter material vegetal suficiente, as seis repetições de cada tratamento foram homogeneizadas formando uma amostra composta. As raízes congeladas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, e a extração do RNA total foi realizada utilizando-se Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

A concentração e pureza de RNA total foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm (SmartSpec 3000, BioRad, Hercules, CA). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2% utilizando-se brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para visualização do mesmo (SAMBROOK; FRITSCH, MANIATIS, 1989).

O RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e a síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando-se o sistema de transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

2.2.1.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão dos genes codificando uma superóxido dismutase (*CuZnSOD*), uma catalase (*CAT*), uma peroxidase (*TPX1*), uma quitinase ácida (*Chi3*), uma quitinase básica (*Chi9*), uma β -1,3-glucanase básica (*GlucB*) e um transportador de fosfato (*LePT4*) em raízes micorrizadas dos mutantes *epi* e *Nr*, e do controle MT, foi determinada utilizando-se RT-qPCR, e o gene do rRNA 18S como controle constitutivo. Os iniciadores gene específico estão descritos na Tabela 2.1. As reações de PCR foram realizadas em solução contendo 1 μL da diluição de cDNA 1:10 (v/v), 10 μM de cada

iniciador e 5 µL de Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG 2X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para um volume final de 10 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Austrália) em triplicata, utilizando as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos e 72 ° por 20 segundos, com a detecção da fluorescência no final da extensão de cada ciclo. Com o término da reação, a curva de dissociação do DNA para cada produto amplificado foi determinada entre 72 °C e 95 °C. Os experimentos incluíram um controle negativo (reação sem cDNA). A eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinada através de curva padrão de diluição serial do cDNA (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). A aquisição dos dados foi feita através do programa Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65 (Corbett), o qual calcula os valores de *cycle threshold* (Ct) e a eficiência da reação de PCR (E).

O cálculo das eficiências de amplificação e também do acúmulo relativo dos transcritos foi feito através do programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384© - version 2) (PFAFFL, 2001; <http://rest.gene-quantification.info/>). Neste trabalho, as raízes não-inoculadas da planta MT foram consideradas como controle.

Tabela 2.1 – Iniciadores gene específico utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	Número de acesso NCBI	Referência
<i>18S rRNA-f</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	110	AY552528	(1)
<i>18S rRNA-r</i>	CCTCCAATGGATCCTCGTTA		AY552528	
<i>CuZnSOD-f</i>	TGTGGTTCATGAGCTTGA	153	X14040	(1)
<i>CuZnSOD-r</i>	TTGGAGTCAAACCAACCAC		X14040	
<i>CAT-f</i>	GATGAGCACACTTTGGAGCA	145	AF112368	(1)
<i>CAT-r</i>	TGCCCTTCTATTGTGGTTCC		AF112368	
<i>TPX1-f</i>	TGCAGCATTGACAACACGTA	112	L13654	(1)
<i>TPX1-r</i>	TCTTCCCATTCTTCTCCATCG		L13654	
<i>Chi3-f</i>	TGCAGGAACATTCACTGGAG	248	Z15141	(2)
<i>Chi3-r</i>	TAACGTTGTGGCATGATGGT		Z15141	
<i>Chi9-f</i>	GAAATTGCTGCTTTCCTTGC	235	Z15140	(2)
<i>Chi9-r</i>	CTCCAATGGCTCTTCCACAT		Z15140	
<i>GlucB-f</i>	TCTTGCCCCATTTCAAGTTC	202	M80608	(2)
<i>GlucB-r</i>	TGCACGTGTATCCCTCAAAA		M80608	
<i>LePT4-f</i>	GAAGGGGAGCCATTTAATGTGG	181	AY885651.1	(3)
<i>LePT4-r</i>	ATCGCGGCTTGTTTAGCATTTTC		AY885651.1	

(1) TYBURSKI et al., 2009; (2) AIMÉ et al., 2008; (3) BALESTRINI et al., 2007.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Biomassa vegetal da parte aérea

A inoculação com *G. clarum* não afetou significativamente a produção de biomassa nos mutantes hormonais de MT (teste Tukey, $p < 0,05$). Da mesma forma, a produção de biomassa não foi estatisticamente diferente entre os mutantes e controle MT (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Biomassa vegetal da parte aérea de plantas de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes superprodutor (*epi*) e com baixa sensibilidade ao etileno (*Nr*) inoculadas com *Glomus clarum* (Gc) e não-inoculadas (Ni). As barras representam o desvio padrão da média (n=6)

2.2.2.2 Colonização fúngica intrarradicular e funcionalidade da simbiose

Os resultados de porcentagem de colonização micorrízica intrarradicular são apresentados na Figura 2.3. A colonização micorrízica no mutante superprodutor de etileno *epi* foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que no controle MT e no mutante insensível ao etileno *Nr*, em todas as épocas de coleta.

A colonização micorrízica no mutante *Nr* não diferenciou estatisticamente do controle MT com 16, 30 e 37 dias após inoculação (DAI). Entretanto, a colonização

micorrízica neste mutante foi aproximadamente duas vezes maior do que em MT após 23 dias de inoculação.

Além da visualização das estruturas fúngicas, a funcionalidade da simbiose também foi avaliada por métodos moleculares. O gene de tomate *LePT4* codifica um transportador de fosfato específico para micorriza arbuscular que é expresso em células contendo arbúsculos, e é considerado um marcador para uma simbiose funcional (BALESTRINI et al., 2007). Aos 23 DAI o acúmulo de transcritos nos mutantes *epi* e *Nr* inoculados com *G. clarum* foi 7 vezes maior em relação ao controle selvagem MT. Já nos 30 DAI, o mutante *Nr* teve uma indução na expressão de aproximadamente 4 vezes tanto em relação ao MT quanto para *epi*. Aos 37 DAI, o mutante *epi* manteve seu padrão de expressão observado aos 23 DAI, e o controle MT aumentou a sua expressão cerca de 7 vezes em relação aos 30 DAI. O mutante *Nr* foi o genótipo que apresentou uma maior indução no acúmulo de transcritos aos 30 e 37 DAI (Figura 2.4).

A quantificação das estruturas fúngicas no interior das raízes foi feita utilizando-se o método ampliado de interseções (*magnified intersections method*). Lâminas foram preparadas com fragmentos de raízes colonizadas por *G. clarum*. Em cada interseção foi avaliado a presença de estruturas fúngicas: arbúsculo, hifa externa, vesícula e apressório.

O mutante *Nr* apresentou uma quantidade significativamente maior de arbúsculos, hifa externa e apressório em relação ao MT e ao mutante *epi* aos 23 dias após inoculação (DAI). A quantidade de vesículas não diferiu estatisticamente entre os três genótipos (Tabela 2.2). Aos 30 DAI, a porcentagem de arbúsculos e apressórios foi significativamente menor no mutante *epi*. Já no final do desenvolvimento da planta, aos 37 DAI, todas as estruturas quantificadas foram menos frequentes no mutante superprodutor de etileno em relação ao mutante insensível ao etileno e ao controle MT. Com exceção da frequência de hifa externa que foi maior no mutante *Nr* em relação ao MT e ao *epi* aos 37 DAI, *Nr* não diferiu significativamente de MT aos 30 e 37 dias, para todas as demais estruturas quantificadas.

Figura 2.3 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. As barras representam o desvio padrão da média (n=6). Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 2.4 – Acúmulo diferencial de transcritos codificando um transportador de fosfato (*LePT4*) específico para simbiose micorrízica em raízes de tomateiro cv Micro-tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA

Tabela 2.2 - Quantificação das estruturas micorrízicas em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT), do mutante superprodutor de etileno (*epi*), e com baixa sensibilidade ao etileno (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os dados são médias de 6 repetições e de 100 leituras. As barras representam o desvio padrão da média. Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Genótipo	Estrutura fúngica			
	Hifa externa	Apressório	Arbúsculo	Vesícula
16 dias após inoculação				
Micro-Tom	3,3 ± 2,4 a	0,7 ± 1,1 a	1,3 ± 2,2 a	0 ± 0
<i>epinastic</i>	8,2 ± 7,2 a	2,3 ± 2,9 a	1,5 ± 1,3 a	0 ± 0,0
<i>Never ripe</i>	17,5 ± 7,5 a	3 ± 1,7 a	6,5 ± 3,8 a	0 ± 0,0
23 dias após inoculação				
Micro-Tom	32,7 ± 12,0 b	7,3 ± 3,7 b	31,5 ± 11,2 b	0,2 ± 0,3 a
<i>epinastic</i>	31,7 ± 12,7 b	5,3 ± 5,1 b	28,7 ± 10,3 b	0,2 ± 0,3 a
<i>Never ripe</i>	55,5 ± 9,3 a	17,5 ± 2,3 a	61,7 ± 9,6 a	2,7 ± 3,1 a
30 dias após inoculação				
Micro-Tom	64,3 ± 14,8 a	21,7 ± 4,1 a	87,2 ± 3,4 a	15,8 ± 6,5 a
<i>epinastic</i>	58,7 ± 11,2 a	11 ± 3,7 b	55,8 ± 14,2 b	8,5 ± 2,0 a
<i>Never ripe</i>	55,3 ± 17,6 a	20,2 ± 5,2 a	80,2 ± 8,8 a	14,8 ± 4,8 a
37 dias após inoculação				
Micro-Tom	53,8 ± 7,2 b	15,7 ± 3,8 ab	96,5 ± 3,0 a	22,7 ± 3,7 a
<i>epinastic</i>	61,2 ± 9,8 b	11 ± 2,7 b	73,2 ± 4,5 b	8,3 ± 2,6 b
<i>Never ripe</i>	80,7 ± 5,4 a	18,7 ± 3,3 a	98,7 ± 1,0 a	22,8 ± 6,8 a

Raízes micorrizadas dos mutantes *epi* e *Nr*, assim como do controle MT foram examinadas utilizando-se microscopia de contraste de fase. O padrão de crescimento do fungo no interior das raízes foi indicativo de colonização tipo *Arum*, com arbúsculos e vesículas abundantes (Figura 2.5). O desenvolvimento de típicos apressórios foi detectado em raízes de MT e no mutante *Nr* (Figuras 2.5 e 2.6). Entretanto, várias alterações morfológicas, tais como abundância de hifas externas com ausência de colonização interna e apressórios proeminentes com hifas sub-epidérmicas abortadas (Figura 2.7) foram observadas nas raízes do mutante *epi*. Número reduzido de vesículas, que foram abundantes em MT e *Nr* no final do desenvolvimento (Figuras 2.5 e 2.6), assim como alta incidência de hifas enroladas dentro das células corticais (Figura 2.7) foi observado no mutante *epi*. Não foram observadas alterações morfológicas no mutante *Nr* em relação ao MT.

Figura 2.5 – Raízes de Micro-Tom colonizadas por *Glomus clarum*. ap – apressório; ab – arbúsculo; ve – vesícula

Figura 2.6 – Raízes do mutante *Never ripe* com baixa sensibilidade ao etileno, colonizadas por *Glomus clarum*. ap – apressório; ab – arbúsculo; ve – vesícula

Figura 2.7 – Raízes do mutante *epinastic* superprodutor de etileno colonizadas por *Glomus clarum*. (A) Abundância de hifas externas de *G. clarum* sem colonização intraradicular. (B) Desenvolvimento anormal de hifas. (C) Ramificação anormal de hifas septadas. (D) Presença de hifas enroladas. (E) Formação atípica de arbúsculo. (F) Infecção limitada.
ap – apressório; ab – arbúsculo; ve – vesícula

2.2.2.3 Expressão diferencial de genes relacionados à defesa vegetal

Considerando as funções do etileno nas respostas de defesa da planta, a expressão dos genes codificando uma quitinase ácida (*Chi3*), uma quitinase básica (*Chi9*), uma β -1,3-glucanase básica (*GlucB*), uma superóxido dismutase (*CuZnSOD*), uma catalase (*CAT*) e uma peroxidase (*TPX1*) foi determinada usando qRT-PCR nas raízes micorrizadas dos mutantes *epi* e *Nr* e no controle MT.

O acúmulo de transcritos para o gene *Chi3* foi maior no mutante *epi* micorrizado em relação aos demais genótipos, para todas as épocas avaliadas. Aos 16 DAI, tanto as raízes de *epi* micorrizadas ($42,5 \pm 13,8$) quanto as não-inoculadas ($34,3 \pm 8,3$) apresentaram um maior acúmulo de transcritos de *Chi3*, enquanto o acúmulo de *Chi3* em raízes micorrizadas do mutante *Nr* e no controle MT foi totalmente reprimido. Aos 23 DAI, o mutante *epi* apresentou uma maior indução no acúmulo de transcritos de *Chi3* ($2,6 \pm 0,7$) chegando a ser 3,6 e 1,7 vezes maior em relação ao MT micorrizado ($0,73 \pm 0,15$) e ao *Nr* micorrizado ($1,6 \pm 0,64$), respectivamente. Aos 30 e 37 DAI, o acúmulo de transcritos para esse gene nos três genótipos de MT avaliados não diferiu (Figura 2.8).

Uma indução no acúmulo de transcritos para o gene *Chi9* foi observada aos 16 DAI. As raízes não-inoculadas do mutante *epi* ($33,5 \pm 4,4$) teve uma indução no acúmulo de transcritos 3 vezes maior do que as raízes de *epi* micorrizadas ($11,2 \pm 2,4$). Além disso, o mutante *epi* micorrizado apresentou um acúmulo de transcritos 2 vezes maior do que o controle micorrizado MT ($5,4 \pm 0,8$), enquanto a expressão deste gene no mutante *Nr* foi totalmente suprimida. Nas demais épocas, não houve indução no acúmulo de transcritos, apesar do mutante *epi* apresentar um acúmulo de transcritos de *Chi9* maior em relação aos demais genótipos (Figura 2.9).

Figura 2.8 – Expressão gênica relativa de uma quitinase ácida (*Chi3*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

Figura 2.9 – Expressão gênica relativa de uma quitinase básica (*Chi9*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

O perfil da expressão do gene *GlucB* que codifica uma β -1,3-glucanase básica está apresentado na Figura 2.10. A indução no acúmulo de transcritos aos 16 DAI foi maior em raízes micorrizadas de MT ($6,5 \pm 1,8$), seguida de *epi* ($4,4 \pm 1,3$) e por último por *Nr* ($19 \pm 0,6$). Indução no acúmulo de transcritos em raízes não micorrizadas só foi observada no mutante *epi* ($87,6 \pm 32,2$) que foi 20 vezes maior do que suas raízes micorrizadas. Aos 23 DAI, foi observado para todos os genótipos aumento na expressão de *GlucB* nas raízes inoculadas com *G. clarum*, sendo que o mutante *Nr* foi o genótipo mais fortemente induzido (256 ± 100), chegando a ser 29 vezes maior do que MT micorrizado ($9,0 \pm 3,8$) e 9 vezes maior do que *epi* micorrizado ($29,6 \pm 13,9$). Aos 30 e 37 dias o acúmulo de transcritos para esse gene nos três genótipos de MT avaliados não diferiu.

Figura 2.10 – Expressão gênica relativa de uma β -1,3-glucanase (*GlucB*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

O perfil de expressão dos genes relacionados ao estresse oxidativo foi semelhante. A expressão do gene *CuZnSOD* foi maior nas raízes micorrizadas do mutante *epi* em relação as raízes micorrizadas do controle MT e do mutante *Nr* para todas as épocas avaliadas. Aos 16 DAI a indução no acúmulo de transcritos foi aproximadamente 2,3 vezes maior nas raízes não-inoculadas ($5,7 \pm 0,56$) em relação às raízes micorrizadas ($2,5 \pm 0,48$) no mutante *epi*. Já para o mutante *Nr* e para o controle MT, a expressão deste gene foi similar tanto para as raízes micorrizadas quanto para as raízes não inoculadas. Além disso, o aumento na expressão de *CuZnSOD* em raízes micorrizadas de *epi* foi aproximadamente 3 vezes maior tanto em relação ao controle selvagem MT micorrizado ($0,89 \pm 0,15$) quanto para o mutante *Nr* micorrizado ($0,8 \pm 0,14$). Aos 23 DAI, um alto acúmulo de transcritos é observado nas raízes micorrizadas nos três genótipos, principalmente para o mutante *epi* ($63,8 \pm 19,2$), que apresentou um acúmulo de transcritos 3 vezes maior do que seu controle não-inoculado ($20,6 \pm 14,2$). Além disso, o aumento na expressão de *CuZnSOD* em raízes micorrizadas de *epi* foi aproximadamente 4 vezes maior em relação ao controle micorrizado MT ($14,5 \pm 4,5$) quanto para o mutante micorrizado *Nr* ($16,2 \pm 4,5$). Aos 30 e 37 dias o acúmulo de transcritos para esse gene nos três genótipos de MT avaliados não diferiu (Figura 2.11).

A expressão do gene *TPX1* que codifica uma peroxidase foi similar à observada para o gene *CuZnSOD* aos 16 DAI. A indução no acúmulo de transcritos tanto no mutante *epi* quanto para *Nr* foi aproximadamente 2,4 vezes maior nas raízes não-inoculadas em relação às raízes micorrizadas. Indução no acúmulo de transcritos aos 23 DAI foi observada nas raízes micorrizadas dos mutantes *epi* ($6,2 \pm 0,56$) e *Nr* ($5,1 \pm 0,9$), que chegou a ser cerca de 2 vezes maior do que seus respectivos controle não-inoculados e 4,5 vezes do que o controle micorrizado MT ($1,1 \pm 0,56$). Não foi observada indução da expressão de *TPX1* aos 30 e 37 DAI seguindo o mesmo perfil de expressão de *CuZnSOD* (Figura 2.12).

Figura 2.11 – Expressão gênica relativa de uma superóxido dismutase (*CuZnSOD*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

Figura 2.12 – Expressão gênica relativa de uma peroxidase (*TPX1*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

O acúmulo de transcritos para o gene *CAT* que codifica uma catalase foi mais atenuado em relação à *CuZnSOD* e *TPX1*. Aos 16 DAI a expressão de *CAT* foi quase 3 vezes maior em raízes micorrizadas de *epi* e *Nr* em relação ao seu controle não-inoculado, seguindo o mesmo perfil de expressão observado para os dois outros genes. Um pequeno aumento na expressão de *CAT* foi observado em raízes micorrizadas tanto do mutante *epi* ($1,2 \pm 0,06$) quanto de *Nr* ($0,87 \pm 0,14$) em relação ao MT micorrizado ($0,47 \pm 0,07$) e aos seus respectivos controle não-inoculados. Aos 30 e 37 DAI o acúmulo de transcritos para os três genótipos de MT não diferiu (Figura 2.13).

Figura 2.13 – Expressão gênica relativa uma catalase (*CAT*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*) inoculados com *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições e as barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene 18S rRNA. Ni, não-inoculado

2.2.3 Discussão

2.2.3.1 Colonização micorrízica em mutantes hormonais de tomateiro

Em estudo anterior, onde foram avaliados vários mutantes hormonais de tomateiro Micro-Tom, foi observado que o etileno pode desempenhar um importante papel no estabelecimento das MAs (ZSOGON et al., 2008). No nosso estudo, o desenvolvimento de MAs foi avaliado nos mutantes *epinastic*, superprodutor de etileno, o qual apresenta epinastia severa, caules e pecíolos dilatados e raízes muito ramificadas, e no mutante *Never ripe*, que é defectivo para o gene receptor de etileno, suas plântulas não apresentam tríplice resposta ao serem tratadas com etileno e seus frutos não amadurecem totalmente.

A colonização intrarradicular por *G. clarum* no mutante *epi* foi significativamente reduzida em relação ao controle MT em todas as épocas de coleta. Contudo, no mutante *Nr*, a colonização não diferiu estatisticamente do MT, embora tenha sido superior ($p < 0,05$) aos 23 dias após inoculação. Vários trabalhos demonstraram que o etileno é considerado um inibidor da formação de MA (AZCÓN-AGUILAR; RODRIGUES-NAVARRO; BAREA, 1981; GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001; GEIL; GUINEL, 2002; ZSÖGÖN et al., 2008) e que, em baixas concentrações, o etileno exógeno pode promover o desenvolvimento intrarradicular do fungo (ISHII et al., 1996; GEIL; GUINEL, 2002). De fato, as raízes micorrizadas do mutante *Nr*, apresentaram uma intensa multiplicação de hifas externas, sendo significativamente maior do que o controle MT aos 23 e 37 DAI, corroborando os dados apresentados por Ishii et al (1996), os quais observaram que, em baixas concentrações, o etileno pode estimular a ramificação e crescimento das hifas dos FMAs.

A quantificação das estruturas fúngicas demonstrou que aos 30 e 37 DAI, a quantidade de arbúsculos, estrutura responsável pela troca de nutrientes entre a planta e o fungo (PARNISKE, 2008), foi significativamente menor no mutante *epi* em relação ao controle MT. Além disso, foram detectados em *epi* alterações morfológicas nas estruturas fúngicas, similares às alterações observadas em mutantes de *Lycopersicon esculentum* defectivos na formação de MA (*reduced mycorrhizal colonization, rmc*)

(BARKER et al., 1998; GAO; DELP; SMITH, 2001). Já o mutante *Nr* não apresentou estruturas micorrízicas diferentes daquelas observadas no MT, sugerindo que o balanço do etileno é importante para o desenvolvimento da simbiose.

Além da quantificação das estruturas fúngicas, a funcionalidade da simbiose foi avaliada por meio do acúmulo de transcritos do gene *LePT4*, o qual codifica um transportador de fosfato específico de MAs, nas raízes (BALESTRINI et al., 2007). O acúmulo de transcritos de *LePT4* nas raízes de *epi* aos 37 DAI foi menor em relação ao *Nr* e ao MT. Entretanto, aos 30 e 37 DAI, o acúmulo de transcritos de *LePT4* nas raízes de *Nr* foi maior do que nas raízes dos dois outros genótipos, demonstrando novamente a importância do balanço do etileno no desenvolvimento e funcionalidade da simbiose.

2.2.3.2 Expressão diferencial de genes que codificam quitinases e β -1,3-glucanase

O etileno pode agir como um sinal indutor de processos fisiológicos tais como a germinação, senescência, epinastia e abscisão, assim como na coordenação da maturação de tecidos nos frutos (LIN; ZHONG; GRIERSON, 2009). Um evento comum de alguns destes processos é a ativação pelo etileno de enzimas hidrolíticas, como as poligalacturonases, glucanases e quitinases. Entre as hidrolases induzidas por etileno, quitinases e β -1,3-glucanases podem ter um importante papel no controle do crescimento intrarradicar dos FMAs (LAMBAIS; MEHDY, 1995).

Aumento transiente nas atividades de quitinases e β -1,3-glucanases têm sido observado durante a formação da MA em diferentes combinações planta-fungo (LAMBAIS; MEHDY, 1993; BLEE; ANDERSON, 1996; LAMBAIS; MEHDY, 1998; SALZER et al., 2000). No modelo proposto por Lambais e Mehdy (1995), isoformas particulares de β -1,3-glucanase induzidas em condições de baixo teor de P poderiam contribuir para a colonização das raízes por meio da hidrólise parcial da parede celular vegetal, facilitando a penetração do fungo. Em contraste, isoformas de quitinases induzidas localmente em condições de alto teor de P regulariam negativamente o crescimento fúngico nas raízes, por meio da degradação controlada da parede celular fúngica. Com base nesse modelo, o alto conteúdo de etileno em *epi* levaria a uma ativação de quitinases, diminuindo o crescimento fúngico intrarradicar, e no mutante

Nr a diminuição na sensibilidade ao etileno poderia resultar em maior crescimento fúngico intrarradicular.

Corroborando o modelo proposto por Lambais e Mehdy (1995), o acúmulo de transcritos de quitinases, principalmente *Chi3* (quitinase ácida) foi maior no mutante *epi* do que no MT. Adicionalmente, o acúmulo de transcritos de *GlucB* (β -1,3-glucanase básica) foi 9 vezes maior no mutante *Nr* do que o mutante *epi*, e 28 vezes maior em relação ao controle MT. O aumento na expressão destes genes foi observado no início do estabelecimento da simbiose, aos 23 DAI, sendo que nas demais épocas (30 e 37 DAI), não houve alteração no acúmulo de transcritos destes genes, corroborando os dados da literatura (LAMBAIS; MEHDY, 1993; BLEE; ANDERSON, 1996; LAMBAIS; MEHDY, 1998; SALZER et al., 2000). O acúmulo de transcritos de *Chi9* (quitinase básica) também foi maior em *epi* em relação aos demais genótipos de MT em todas as épocas de coleta, porém sua expressão foi mais atenuada do que *Chi3*. Sabe-se que o etileno induz a expressão de genes que codificam quitinases básica (BARRY et al., 2001) e indução no acúmulo de transcritos de *Chi9* foi observada no mutante *epi* em relação ao controle selvagem MT (ZSÖGÖN et al., 2008).

Em um trabalho anterior, em que Zsögön et al. (2008), fizeram uma triagem de mutantes hormonais de tomateiro, e verificaram que o etileno exerce um papel no desenvolvimento da simbiose MA, não foi verificada alteração no acúmulo de transcritos para o gene que codifica uma β -1,3-glucanase básica (*TomPR-Q'b*) no mutante *Nr* em relação ao controle selvagem MT. No entanto, a avaliação nesses experimentos foi feita somente aos 37 DAI, não sendo feito, portanto, uma avaliação temporal do acúmulo de transcritos para determinar em qual fase do desenvolvimento da simbiose estes genes seriam diferencialmente expressos.

Os resultados obtidos para os genes *Chi3* e *GlucB* neste estudo corroboram o modelo proposto por Lambais e Mehdy (1995). A superprodução de etileno observada no mutante *epi* levou a uma alta indução no acúmulo de transcritos de *Chi3*, o que poderia explicar a colonização reduzida observada neste mutante. De modo contrário, a baixa sensibilidade ao etileno observada no mutante *Nr*, induziu a expressão de *GluB* favorecendo o desenvolvimento da simbiose. Esses resultados demonstram que o balanço do etileno nas plantas altera a expressão de genes associados com o sistema

de defesa vegetal que poderiam estar envolvidos no controle do desenvolvimento das MAs.

2.2.3.3 Expressão diferencial de genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo

Existem muitas similaridades entre as respostas iniciais da infecção por organismos patogênicos e simbióticos (TORRES, 2010). A geração de EROs nos estágios iniciais da simbiose é um mecanismo similar à explosão oxidativa induzida por patógenos (FESTER; HAUSE, 2005). Entretanto, a maioria das respostas de defesa da planta em MAs são atenuadas quando comparadas a interações patogênicas, e várias são ativamente suprimidas (LAMBAIS; MEHDY, 1995). Estas observações sugerem que as MAs desenvolveram mecanismos específicos de proteção para neutralizar as respostas de defesa da planta, particularmente controlando o acúmulo de EROs.

O acúmulo de EROs pode ser potencializado por fitormônios tais como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (BOUCHEZ et al., 2007). Para controlar a toxicidade de EROs, as células desenvolveram uma variedade de sistemas antioxidantes para sequestrar eficientemente o excesso de EROs e manter a produção de EROs e sistemas antioxidantes em equilíbrio. Um importante sistema antioxidante inclui enzimas tais como superóxido dismutases (SODs), catalases (CAT) e peroxidases (TPX). Neste trabalho foi observado que no início do desenvolvimento da simbiose, aos 16 DAI, os níveis de transcritos dos genes codificando *CuZnSOD*, *CAT* e *TPX1* apresentaram o mesmo comportamento. Somente o mutante *epi* não-inoculado apresentou aumento de cerca de 3 vezes no acúmulo de transcritos, em relação ao seu tratamento micorrizado. Os demais genótipos, MT e *Nr*, não apresentaram alteração no acúmulo de transcritos desses genes. É provável que no início do estabelecimento da simbiose não haja alteração da expressão de genes relacionados ao sistema antioxidativo, demonstrando neste caso, que somente a superprodução de etileno exerce um efeito na regulação destes genes (BOUCHEZ et al., 2007).

Aos 23 DAI, houve uma forte indução no acúmulo de transcritos, principalmente para o gene *CuZnSOD*. As plantas MT apresentaram indução de aproximadamente 10

vezes no acúmulo de transcritos de *CuZnSOD*, em relação ao seu controle não-inoculado. Esses dados corroboram os dados da literatura, mostrando que em MAs, a indução de enzimas antioxidantes, tais como SOD, CAT e TPX é parte do mecanismo para atenuação do sistema de defesa da planta (SALZER; CORBIÈRE; BOLLER, 1999; BLILOU et al. 2000; LAMBAIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003; FESTER; HAUSE 2005; WU; XIA; ZOU, 2006; BRESSANO et al., 2010). Já o mutante *epi* apresentou um acúmulo de transcritos de *CuZnSOD* aproximadamente 5 vezes maior tanto para o seu controle não-inoculado quanto para o seu controle MT micorrizado, demonstrando o efeito do etileno durante o estabelecimento da simbiose e na regulação de *CuZnSOD*.

Superóxido dismutases são metaloenzimas que formam um sistema de defesa antioxidante celular primário convertendo radicais superóxido em oxigênio e H_2O_2 , que é então convertido em oxigênio molecular e água por catalases ou peroxidases (MITTLER, 2002). Em MAs, o acúmulo de H_2O_2 tem sido observado próximo a membrana periarbuscular, especialmente em células contendo agregados de arbúsculos, assim como nas extremidades das hifas do fungo durante a penetração na célula do hospedeiro (SALZER; CORBIÈRE; BOLLER, 1999). Além disso, acúmulo intracelular de H_2O_2 foi encontrado no citoplasma de *Zea mays* colonizada por *G. intraradices*, próximo a estruturas fúngicas intactas e colapsadas, enquanto que H_2O_2 intercelular foi localizado na superfície da hifa fúngica (FESTER; HAUSE, 2005). Tem sido mostrado que atividade de SOD é aumentada em raízes micorrizadas (PALMA et al., 1993; ARINES et al., 1994; RUIZ-LOZANO; AZCÓN; PALMA, 1996). Esta indução pode estar associada com altos níveis de H_2O_2 , que por sua vez, está associado com o reconhecimento fúngico e ativação do sistema de defesa da planta.

Indução no acúmulo de transcritos de *TPX1* também foi observada aos 23 DAI, porém somente para os mutantes *epi* e *Nr*, sendo que esta indução foi atenuada em relação ao gene *CuZnSOD*. Um perfil semelhante de expressão foi observado para o gene *CAT*. As duas linhagens de mutantes são afetadas diferencialmente na via de sinalização do etileno. O mutante *Nr* é defeitivo para o gene receptor de etileno (WILKINSON et al., 1995), enquanto *epi* é ativado constitutivamente em um conjunto de respostas do etileno e também exhibe elevada síntese de etileno (BARRY et al., 2001). Assim, a regulação da expressão de *TPX1* e *CAT* durante o estabelecimento da

simbiose, pode ocorrer na percepção do etileno ou por alteração nos níveis de etileno endógeno.

A função do etileno nos processos de resposta de defesa e morte celular programada foi estudada utilizando como modelo o mutante *vad1-1* (*lesion mimic mutant*). Este mutante acumula elevados níveis de EROs, avaliados através da expressão do gene *AtrbohD* (LORRAIN et al., 2004). Cruzamentos do mutante *vad1-1* com mutantes insensível ao etileno (*ein2*, *ein3*, *ein4*) reduziram drasticamente a expressão do gene *AtrbohD*, sugerindo que o etileno pode potencializar o acúmulo de EROs (BOUCHEZ et al., 2007). Utilizando aplicação de ozônio para estudar a ativação de resposta de defesa, foi demonstrado que a produção de H_2O_2 em plantas de tomate expostas a O_3 depende tanto da síntese quanto da percepção do etileno (MOEDER et al., 2002). Além disso, tanto o acúmulo de H_2O_2 quanto a biossíntese do etileno apresentaram co-localização principalmente nas células do parênquima, sugerindo que altas concentrações de etileno e EROs ocorrem na mesma célula de uma maneira coordenada (OVERMYER; BROSCHE; KANGASJARVI, 2003). Tendo como base estes modelos, é possível que o etileno atue como um regulador no processo de geração de EROs que ocorre em MA durante o estabelecimento da simbiose. É possível que a redução na colonização micorrízica no mutante superprodutor de etileno seja devido a uma maior indução na produção de EROs. Como a SOD representa a primeira linha de defesa contra os danos ocasionados pelas EROs, é provável que o etileno regule a expressão de SOD, induzindo sua expressão a fim de remover a grande quantidade de EROs produzida. Agindo em conjunto com SOD, CAT e TPX são ativadas em níveis suficientes para converter o H_2O_2 produzido pela SOD e garantir a transdução de sinal, evitando os danos de uma explosão oxidativa. Pode-se especular também que como a expressão de *TPX1* e *CAT* no mutante *epinastic* não foi tão fortemente induzida, como foi observado para *CuZnSOD*, é possível que o H_2O_2 produzido pela SOD não tenha sido removido eficientemente pela TPX e CAT. Tem sido demonstrado que o H_2O_2 pode agir como um mensageiro secundário nas vias de transdução de sinal levando a ativação de genes de defesa (LAMBAIS, 2000). Sendo assim, como H_2O_2 não foi eficientemente removido, demonstrado pela baixa expressão de *TPX1* e *CAT* em relação a *CuZnSOD*, é de se esperar que ocorra um aumento na expressão de genes

relacionados a defesa vegetal, o que foi observado neste trabalho para quitinases em raízes micorrizadas de *epi*. Esta indução na expressão de quitinases pode ser prejudicial para o estabelecimento da simbiose, impedindo o desenvolvimento da MA, como demonstra os resultados da colonização no mutante *epi*.

2.3 Conclusões

Neste trabalho foi observado que o etileno exerce uma importante função durante o desenvolvimento da simbiose MA. A colonização de *G. clarum* no mutante superprodutor de etileno, *epi*, foi significativamente reduzida quando comparada com o controle MT. Além disso, a funcionalidade da simbiose, demonstrada pela expressão do transportador de fosfato *LePT4* específico da simbiose, foi fortemente reduzida quando comparada com MT. Por outro lado, o padrão de colonização e funcionalidade da simbiose no mutante com baixa sensibilidade ao etileno, *Nr*, não diferiu de MT. Indução no acúmulo de transcritos de genes que codificam quitinases e genes que codificam enzimas relacionadas ao estresse oxidativo foi observada no mutante *epi*, enquanto a expressão do gene que codifica uma β -1,3-glucanase básica foi fortemente induzida no mutante *Nr*. É possível que o etileno module o sistema de defesa vegetal da planta durante o desenvolvimento da simbiose MA, permitindo o estabelecimento e funcionalidade da simbiose.

Referências

- AIMÉ, S.; CORDIER, C.; ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C. Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 73, p. 9-15, 2008.
- ALGUACL, M.M.; HERNÁNDEZ, J.A.; CARAVACA, F.; PORTILLO, B.; ROLDÁN, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 118, p. 562-570, 2003.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARINES, J.; QUINTELA, M.; VILARINO, A.; PALMA, J.M. Protein patterns and superoxide dismutase activity in non-mycorrhizal and arbuscular mycorrhizal *Pisum sativum* L. plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 166, p. 37-45, 1994.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 391-396, 2006.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; RODRIGUES-NAVARRO, D.N.; BAREA, J.M. Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in Medicago and Triticum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 60, p. 461-468, 1981.
- BALESTRINI, R.; GÓMEZ-ARIZA, J.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P. Laser Microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v. 20, n. 9, p. 1055-1062, 2007.
- BARKER, S.J.; STUMMER, B.; GAO, L.; DISPAIN, I.; O'CONNOR, P.J.; SMITH, S.E. A mutant in *Lycopersicon esculentum* Mill. With highly reduced VA mycorrhizal colonization: isolation and preliminary characterization. **The Plant Journal**, Oxon, v. 15, n. 6, p. 791-797, 1998.

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

BLEE, K.A.; ANDERSON, A.J. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 2, p. 675-688, 1996

BLILOU, I.; BUENO, P.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. **Mycological Research**, New York, v. 194, n. 6, p. 722-725, 2000.

BOUCHEZ, O.; HUARD, C.; LORRAIN, S.; ROBY, D.; BALAGUÉ, C. Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the Arabidopsis lesion mimic mutant *vad1^{1[w]}*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 465-477, 2007.

BRESSANO, M.; CURETTI, M.; GIACHERO, L.; GIL, S.V.; CABELLO, M.; MARCH, G.; DUCASSE, D.A.; LUNA, C.M. Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, p. 1622-1626, 2010.

FESTER, T.; HAUSE, G. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 15, p. 373-379, 2005.

GAO, L.L.; DELP, G.; SMITH, S.E. Colonization patterns in a mycorrhiza-defective mutant tomato vary with different arbuscular-mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 151, p. 477-491, 2001.

GEIL, R.D.; GUINEL, F.C. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, p. 114-119, 2002.

GEIL, R.D.; PETERSON, R.L.; GUINEL, F.C. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, p. 137-143, 2001.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, p. 489-500, 1980.

GHORBANLI, M.; EBRAHIMZADEH, H.; SHARIFI, M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 48, p. 575-581, 2004.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 205-227, 2005.

ISHII, T.; SHRESTHA, Y.H.; MATSUMOTO, I.; KADOYA, K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 65, p. 525-529, 1996.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 6, n. 1, p. 75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p.S533-S540, 1995.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, New York, v. 140, n. 1, p. 33-42, 1998.

LAMBAIS, M.R.; RIOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxon, v. 160, n. 2, p. 421-428, 2003.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 12, p. 1-26, 2009.

LORRAIN, S.; LIN, B.; AURIAC, M.C.; KROJ, T.; SAINDRENAN, P.; NICOLE, M.; BALAGUE, C.; ROBY, D. Vascular associated death1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2217–2232, 2004.

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 115, p. 495-501, 1990.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOEDER, W.; BARRY, C.S.; TAURIAINEN, A.A.; BETZ, C.; TUOMAINEN, J.; UTRIAINEN, M.; GRIERSON, D.; SANDERMANN, H.; LANGEBARTELS, C.; KANGASJARVI, J. Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 4, p. 1918–1926, 2002.

MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 27, n. 5, p. 697-701, 1989.

OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; KANGASJARVI, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 7, p. 335-342, 2003.

PALMA, J.M.; LONGA, M.A.; DELRIO, L.A.; ARINES, J. Superoxide-dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red-clover plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 87, p. 77–83, 1993.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews**, London, v. 6, p. 763-775, 2008.

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

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, n. 23, p. 1-11, 2010.

RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, p. 309-317, 2003.

RUIZ-LOZANO, J.M.; AZCÓN, R.; PALMA, J.M. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. **New Phytologist**, New York, v. 134, p. 327-333, 1996.

RUIZ-LOZANO, J.M.; COLLADOS, C.; BAREA, J.M.; AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, New York, v. 151, p. 493-502, 2001.

SALZER, P.; BONANOMI, A.; BEYER, K.; VOGELI-LANGE, R.; AESCHBACHER, R.A.; LANGE, J.; WIEMKEN, A.; KIM, D.; COOK, D.R.; BOLLER, T. Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, n. 7, p. 763-777, 2000.

SALZER, P.; CORBIÈRE, H.; BOLLER, T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. **Planta**, New York, v. 208, p. 319-325, 1999.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual III. S.1. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. 1v.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.1, p. 231-233, 1975.

SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. Amsterdam: Academic Press, 2008. 769 p.

SPANU, P.; BOLLER, T.; LUDWIG, A.; WIEMKEN, A.; FACCIO, A.; BONFANTE-FASOLO, P. Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. **Planta**, New York, v. 177, p. 447-455, 1989.

TORRES, M.A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 138, p. 414-429, 2010.

TYBURSKI, J.; DUNAJSKA, K.; MAZUREK, P.; PIOTROWSKA, B.; TRETYN, A. Exogenous auxin regulates H₂O₂ metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 31, p. 249-260, 2009.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHE, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; MOHR, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and beta-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 143, n. 3, p. 337-343, 1994.

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

WU, Q.S.; XIA, R.X.; ZOU, Y.N. Reactive oxygen metabolism in mycorrhizal and non-mycorrhizal citrus (*Poncirus trifoliata*) seedlings subjected to water stress. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, p. 1101-1110, 2006.

ZSÖGÖN A.; LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259-267, 2008.

3 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS AS VIAS DE BIOSSÍNTESE DE ETILENO E ÁCIDO ABSCÍSIKO EM MUTANTES DE TOMATEIRO *epinastic*, *notabilis* E *sitiens* COLONIZADOS POR *Glomus clarum*

Resumo

Tem sido proposto que, além do etileno, o hormônio vegetal ABA exerce uma importante função no estabelecimento e desenvolvimento da micorriza arbuscular (MA). Para verificar se a colonização reduzida observada em mutantes *sitiens* (*sit*) é dependente da produção de etileno, os mutantes de tomateiro superprodutor de etileno, *epinastic* (*epi*) e deficientes em ABA, *notabilis* (*not*) e *sit* foram inoculados com *G. clarum*. O mutante *sit* apresenta uma mutação mais drástica em relação ao mutante *not*, com um fenótipo mais característico de uma severa deficiência em ABA e superprodução de etileno. A aplicação do inibidor de etileno aminoethoxivinilglicina (AVG) foi feita utilizando duas concentrações (10 μ M e 100 μ M) para estabelecer a função do ABA durante a formação de MA. A expressão diferencial dos genes que codificam enzimas chave na via de biossíntese do etileno (*LeACO2*, *LeACO1* e *LeACO4*) e na via de biossíntese de ABA (*LeNCED*) foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. A colonização intrarradicular de *G. clarum* nos mutantes *epi* e *not* foi significativamente reduzida em relação ao MT, sendo que o mutante *sit* foi o menos susceptível à colonização em relação aos demais genótipos. O mutante *epi* restaurou completamente a colonização micorrízica com aplicação de AVG a 10 μ M. A aplicação de AVG a 100 μ M foi tóxica para as plantas, já que todos os genótipos apresentaram redução significativa da biomassa seca da parte aérea neste tratamento. Apesar de ter sido observado aumento da colonização nos mutantes *not* e *sit* que receberam AVG, as taxas de colonização continuaram sendo significativamente menores ($p < 0,05$) em relação à planta selvagem MT. A expressão do gene específico da simbiose, *LePT4*, confirmou os resultados de colonização. Os genes *LeACS2* e *LeACO4* apresentaram indução no acúmulo de transcritos em raízes micorrizadas de MT, enquanto que em raízes micorrizadas do mutante *epi* não foi observado aumento do acúmulo de transcritos para estes dois genes, demonstrando que *LeACS2* e *LeACO4* são regulados positivamente pela inoculação com *G. clarum*. A restauração no desenvolvimento da MA observada em *epi* que recebeu AVG, provavelmente se faz via ACC oxidase (*LeACO4*), já que este foi o único gene induzido nas raízes micorrizadas de *epi* que receberam AVG, além disso, os genes *LeACO1* e *LeACO4* foram significativamente induzidos em *sit*, mostrando que a superprodução de etileno observada neste mutante pode ser via ACC oxidase. Por fim, indução no acúmulo de transcritos do gene *LeNCED* foi observada em todos os genótipos micorrizados e em raízes de *epi* que receberam AVG, demonstrando que *LeNCED* é regulado positivamente pela inoculação com *G. clarum* e que o etileno regula a expressão de *LeNCED*.

Palavras-chave: Micro-Tom; Micorriza arbuscular; ACC sintase; ACC oxidase; 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED)

Abstract

It has been proposed that in addition to ethylene, the plant hormone ABA plays an important role in the establishment and development of arbuscular mycorrhizae (AM). Aiming to check if reduced colonization observed in mutant *sitiens* (*sit*) is dependent on the production of ethylene, the mutant tomato ethylene overproducer, *epinastic* (*epi*) and deficient in ABA, *notabilis* (*not*) and *sit* were inoculated with *G. clarum*. The mutant *sit* has the most drastic mutation compared to *not* and *sit* shows a phenotypic feature of severe deficiency in ABA and ethylene overproduction. It was performed applying the ethylene inhibitor aminoethoxivinylglycine (AVG) using two concentrations (10 μ M and 100 μ M) to establish the role of ABA during the formation of MA. The differential expression of genes encoding key enzymes in the biosynthesis of ethylene (*LeACO2*, *LeACO1* and *LeACO4*) and in the biosynthesis of ABA (*LeNCED*) was assessed by quantitative real time PCR. The intraradical colonization of *G. clarum* in *epi* and *not* mutants was significantly reduced compared to that of MT and *sit* mutant was less susceptible to colonization in comparison with other genotypes. The *epi* mutant completely restored the mycorrhizal colonization with application of 10 μ M AVG. The application of AVG to 100 μ M was toxic to plants since all genotypes showed a significant reduction in shoot dry biomass in this treatment. Although it was observed increased colonization in *not* and *sit* mutants that received AVG, the colonization rates remained significantly lower ($p < 0.05$) compared to that of MT wild plant. The symbiosis specific gene expression, *LePT4*, confirmed the results of colonization. *LeACS2* and *LeACO4* genes showed induction in transcripts accumulation in mycorrhizal roots of MT whereas in mycorrhizal root of *epi* mutant, it was not observed increased of transcripts accumulation for these two genes demonstrating that *LeACS2* and *LeACO4* are regulated positively by inoculation with *G. clarum*. The restoration in the development of MA observed in *epi* which received AVG is probably done via ACC oxidase (*LeACO4*) since this was the only gene induced in mycorrhizal roots of *epi* that received AVG; moreover, *LeACO1* and *LeACO4* genes were significantly induced in *sit* showing that overproduction of ethylene in this mutant can be observed via ACC oxidase. Finally, induction in the transcripts accumulation of gene *LeNCED* was observed in all genotypes and mycorrhizal roots of *epi* which received AVG demonstrating that *LeNCED* is regulated positively by the inoculation with *G. clarum* and that ethylene regulates the expression of *LeNCED*.

Keywords: Micro-Tom; Mycorrhiza; ACC synthase; ACC oxidase; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)

3.1 Introdução

Micorriza arbuscular (MA) é uma associação simbiótica entre fungos da divisão Glomeromycota e a maioria das espécies vegetais (SMITH; READ, 2008). O estabelecimento da MA é uma estratégia eficaz que melhora o estado nutricional de ambos os parceiros. A eficiência da simbiose deve-se principalmente ao desenvolvimento de uma extensiva rede de hifas fúngicas que se ramificam além da rizosfera e absorvem eficientemente nutrientes minerais de baixa mobilidade no solo (principalmente fósforo), os quais são transferidos para planta por estruturas intracelulares altamente ramificadas denominadas arbúsculos. Através da membrana periarbuscular, a planta transfere carboidratos para o fungo (PARNISKE, 2008).

O estabelecimento e funcionamento da simbiose requerem um alto grau de coordenação entre os dois parceiros com base em um diálogo molecular finamente regulado (PASZKOWSKI, 2006; HAUSE et al., 2007; REQUENA et al., 2007). Após o reconhecimento do FMA, a planta acomoda ativamente o fungo no tecido radicular (GENRE et al., 2008), controlando seu crescimento, o que implica em uma importante reprogramação transcricional na planta. Compreender as bases moleculares da simbiose é um desafio constante, e alguns genes da planta associados especificamente com o estabelecimento e desenvolvimento da simbiose tem sido identificados em diferentes espécies de plantas, sendo a maioria leguminosas (GRUNWALD et al., 2004; HOHNJEC et al., 2005; LIU et al., 2007; SICILIANO et al., 2007; GUETHER et al., 2009). Algumas das alterações fisiológicas que ocorrem no hospedeiro durante a simbiose estão relacionadas a modificações na abundância relativa de fitormônios (HAUSE et al., 2007). Entre os hormônios vegetais, etileno, ácido salicílico, ácido abscísico (ABA) e ácido jasmônico são conhecidos por serem elementos chaves na regulação das respostas de defesa da planta durante a interação com outros organismos (PIETERSE et al., 2009).

Existem evidências de que etileno, um fitormônio gasoso com várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, pode ter um papel importante na regulação da formação das MAs. Etileno é primariamente considerado como inibidor da formação de MA e este efeito tem sido demonstrado em várias combinações de fungo-

hospedeiro. Azcón-Aguilar et al. (1981) foram os primeiros a relatar redução na colonização intrarradicular por *Glomus mosseae* em alfafa e trigo como resultado do tratamento do substrato de cultivo com ethrel. Eles observaram que a redução da colonização era maior com o aumento da concentração de ethrel no solo. Similarmente, Morandi (1989) relatou que uma aplicação semanal de ethrel no solo resulta em uma redução significativa da colonização das raízes de soja por *Glomus fasciculatum*. No entanto, existem vários problemas inerentes no uso de ethrel como fonte de etileno. Um dos mais importantes é a liberação de fosfato, o que, por si, pode reduzir a colonização intrarradicular (SMITH; READ, 1997). Em estudos semelhantes, diminuição na colonização de raízes de ervilha e alho-porró por FMAs com o aumento na quantidade de etileno aplicada, em baixas concentrações de P, também foram observadas (GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001; GEIL; GUINEL, 2002; GUINEL; GEIL, 2002). Entretanto, Ishii et al. (1996), usando *Poncirus trifoliata* inoculada com *Gigaspora ramisporophora*, demonstraram que o etileno pode tanto inibir quanto estimular a formação da MA, dependendo da concentração aplicada. A análise de mutantes de tomateiro em cinco classes hormonais introgrididos na cultivar Micro-Tom (MT) mostrou que os mutantes *epinastic* (superprodutor de etileno) e *Never ripe* (insensível ao etileno) apresentam menor taxa de colonização intrarradicular por *G. clarum* do que o genótipo MT. Para as demais classes hormonais não foram observadas alterações significativas na colonização fúngica (ZSÖGÖN et al., 2008).

É bem documentado que ABA e etileno são antagônicos na modulação do desenvolvimento vegetal (BEAUDOIN et al., 2000; GHASSEMIAN et al., 2000), crescimento da parte aérea (SHARP et al., 2000) e resistência a patógenos (ANDERSON et al., 2004). Tem sido proposto que ABA é necessário também para o desenvolvimento de MAs (HERRERA-MEDINA et al., 2007). Decréscimo na colonização intrarradicular por *Glomus intraradices* foi observado no mutante de tomateiro *sitiens* (deficiente em ABA) em relação às plantas selvagens. Além disso, observações ao microscópio mostraram que a quantidade e a morfologia de arbúsculos nesse mutante foram menores do que nas plantas selvagens (HERRERA-MEDINA et al. 2007). Contudo, é importante considerar que mutantes de tomateiro deficientes em ABA possuem teores elevados de etileno (SHARP et al., 2000), o que já é suficiente

para inibir a formação de MA, como demonstrado por Zsögön et al. (2008). Uma indicação disso foi o fato do tratamento com tiosulfato de prata (STS), um inibidor da ação de etileno, ter aumentado a taxa e a eficiência de colonização em plantas controle e no mutante *sitiens* (HERRERA-MEDINA et al., 2007). Porém, o tratamento com STS não foi capaz de resgatar totalmente a capacidade de formação de MA em *sitiens*, demonstrando que a deficiência de ABA também possui um efeito inibitório direto, além daquele mediado por etileno (HERRERA-MEDINA et al., 2007).

Os mutantes *notabilis* e *sitiens*, os quais possuem diferentes deficiências em ABA e um excesso de etileno, foram utilizados para verificar se a reduzida taxa de colonização intrarradicular observadas em *sitiens* está associada a sua incapacidade de sintetizar ABA, e se este efeito é dependente da produção de etileno (RODRIGUEZ et al., 2010). O mutante *sitiens* mostrou uma grande limitação na colonização fúngica intrarradicular bem correlacionada com sua incapacidade na biossíntese de ABA. Entretanto, o mutante *notabilis* foi menos afetado na sua capacidade de formação de MA, e os dois mutantes mostraram aumentos similares no conteúdo de etileno, sugerindo que ABA pode estar envolvido no desenvolvimento da simbiose de forma independente de etileno (RODRIGUEZ et al., 2010).

Sabendo-se que etileno e ABA exercem importantes funções no desenvolvimento de MAs, e que estes agem antagonicamente, é de fundamental importância estudar os genes que codificam enzimas chave nas vias biossintéticas destes hormônios. O objetivo deste trabalho é determinar se o desenvolvimento de MA em mutantes hormonais de tomateiro da cultivar Micro-Tom superprodutor de etileno (*epinastic*) e deficientes em ABA (*notabilis* e *sitiens*) está associada à expressão de genes que codificam enzimas da via biossintética do etileno (ACC sintase e ACC oxidase) e da via biossintética do ácido abscísico ABA (NCED).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Material vegetal e Fungo Micorrízico Arbuscular

Mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn *Solanum lycopersicum* L.) superprodutor de etileno (*epinastic*, BARRY et al., 2001), e deficientes em ABA (*notabilis*, BURBIDGE et al., 1999; e *sitiens*, TAYLOR et al., 1988) foram obtidos do “Tomato Genetic Research Center” (Universidade da Califórnia, Davis) e introgrididos no modelo genético Micro-Tom (MT), obtidos de “Weizmann Institute of Science” (Israel). A introgressão das mutações em MT foi realizada como descrita por Pino et al. (2010).

Glomus clarum foi multiplicado em associação com raízes de *Brachiaria decumbens* em vasos contendo areia e vermiculita como substrato, em condições de casa de vegetação.

3.2.1.2 Instalação dos experimentos e condições de crescimento

Sementes de MT e dos mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) foram semeadas em bandejas de isopor® contendo substrato esterilizado composto por areia lavada e vermiculita (2:1, v/v).

Plântulas que apresentavam três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos plásticos contendo 400 g do substrato e adubadas com: 240 mg N kg⁻¹ (dividido em três aplicações a cada 10 dias, na forma de NH₄NO₃), 270 mg K kg⁻¹ (na forma de KCl), 120 mg Ca kg⁻¹ (na forma de CaCl₂.2H₂O), 60 mg Mg kg⁻¹ (na forma de MgSO₄.7H₂O), 1 mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1 mL de solução de micronutrientes de Hoagland por vaso (SARRUGE, 1975). A adubação fosfatada foi feita com 10 mg P kg⁻¹ substrato (na forma de KH₂PO₄). Uma vez por semana, as plantas foram suplementadas com solução de Hoagland sem P.

A inoculação com o fungo micorrízico *G. clarum* foi realizada no momento do transplântio. O inóculo (aproximadamente 10 mL) era constituído de uma mistura de solo, esporos fúngicos e fragmentos de hifas e raízes de *Brachiaria decumbens* colonizadas, obtidas de vasos de multiplicação. Tratamentos controle não micorrizados foram inoculados com uma mistura de solo e raízes de *B. decumbens* não micorrizadas (10 mL).

O tratamento químico com AVG (aminoethoxivinilglicina, ReTain – Sumitomo Chemical) foi feito uma vez por semana nas concentrações 10 µM e 100 µM. A primeira aplicação foi feita no momento do transplântio, juntamente com a inoculação com *G. clarum*. O AVG bloqueia a síntese do etileno, inibindo a atividade enzimática responsável pela conversão do S-adenosil metionina (SAM) para o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).

Os tratamentos foram arranjados em blocos casualizados, com 6 repetições por tratamento. O experimento foi conduzido em condições de casa-de-vegetação, com temperatura média de 28 °C e umidade relativa de 50%.

A colheita foi feita 37 dias após inoculação (Figura 3.1). As raízes foram lavadas em água corrente e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente. Foram retirados pequenos fragmentos ao longo de toda a raiz para avaliação da colonização intrarradicular. As raízes restantes foram imediatamente congelado em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para as análises moleculares.

3.2.1.3 Avaliação da colonização micorrízica

As raízes foram tratadas com solução de KOH 10% a 90 °C por 30 min e transferidas para uma solução 5% de tinta QuInk (Parker) diluída em solução de ácido acético 5% a 90 °C durante 3 min, lavadas em ácido acético 5% e armazenadas em lactoglicerol (VIERHEILIG et al., 1998).

A taxa de colonização foi determinada pela presença de estruturas fúngicas no tecido cortical, utilizando-se um microscópio estereoscópico (aumento de 72 vezes) e placas reticuladas, de acordo com Giovanetti e Mosse (1980).

A presença de arbúsculos, vesículas e hifas no interior das raízes e de apressórios foi determinada após análise por microscopia de contraste de fase utilizando um microscópio Eclipse E800 (Nikon, Japan) acoplado a uma câmera digital Exwave HAD (Sony, Japan). A quantificação das estruturas fúngicas (arbúsculo, vesícula, hifa externa e apressório) foi feita segundo o método ampliado de interseções (McGONIGLE et al., 1990). Para cada uma das seis repetições de cada tratamento foram preparadas duas lâminas, cada uma contendo 10 fragmentos de raiz de aproximadamente 1 cm. Para cada fragmento foi examinado cinco diferentes pontos de interseção, totalizando 100 leituras para cada repetição biológica. Para cada ponto verificou-se a presença das estruturas fúngicas e o percentual de incidência de cada estrutura foi calculado pelo total de pontos.

3.2.1.4 Análises estatísticas

Os dados foram analisados através do programa Sisvar Versão 5.1. Para normalização, os dados foram transformados para $\text{arc sen } (x+1)^{0,5}$. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3.1 – Material vegetal utilizado no presente trabalho. MT – Micro-Tom; epi – *epinastic*; not – *notabilis*; sit – *sitiens*

3.2.1.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para obter material vegetal suficiente, duas repetições de cada tratamento foram homogeneizadas formando uma amostra composta, totalizando três repetições biológicas. As raízes congeladas foram maceradas em almofariz contendo nitrogênio líquido e a extração de RNA total foi realizada utilizando-se Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

A concentração e pureza de RNA total foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm (SmartSpec 3000, BioRad, Hercules, CA). A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2 % utilizando-se brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para visualização do mesmo (SAMBROOK; FRITSCH, MANIATIS, 1989).

O RNA total foi tratado com DNase I (Invitrogen, São Paulo, Brasil), e a síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando o sistema de transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

3.2.1.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão dos genes que codifica as enzimas ACC sintase (*LeACS2*), ACC oxidase (*LeACO1* e *LeACO4*) envolvidas na biossíntese do etileno, 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (*LeNCED1*), enzima chave na biossíntese de ABA e um transportador de fosfato (*LePT4*) específico da simbiose MA foi determinada utilizando análises de RT-qPCR, e o gene do rRNA 18S como um controle constitutivo. Os iniciadores gene específico estão descritos na Tabela 3.1. As reações de PCR foram realizadas em solução contendo 1 μL da diluição de cDNA 1:10 (v/v), 10 μM de cada iniciador e 5 μL de Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG 2X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), para um volume final de 10 μL . As amplificações foram realizadas em termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science, Austrália) em triplicata, utilizando as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 ° por 20 segundos, com a detecção na fluorescência no final

da extensão de cada ciclo. Com o término da reação, a curva de dissociação do DNA para cada produto amplificado foi determinada entre 72 °C e 95 °C. Os experimentos incluíram um controle negativo (reação sem cDNA). A eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinada através de curva padrão de diluição serial do cDNA (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000). A aquisição dos dados foi feita através do programa Rotor Gene Real Time Analysis 1.7.65 (Corbett), o qual calcula os valores de cycle threshold (Ct) e a eficiência da reação de PCR (E).

O cálculo das eficiências de amplificação e também do acúmulo relativo dos transcritos foi feito através do programa *Relative Expression Software Tool* (REST-384© - version 2) (PFAFFL, 2001), (<http://rest.gene-quantification.info/>). Neste trabalho, as raízes não inoculadas da planta selvagem MT foram consideradas como controle. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa (REST, 2009). Este programa utiliza métodos de randomização e *bootstrapping* para testar a diferença significativa da expressão gênica e calcula intervalos de confiança de 95% para as mudanças relativas da expressão.

Tabela 3.1 – Iniciadores gene específico utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Número de acesso NCBI	Referência
<i>18S rRNA-f</i>	AAACGGCTACCACATCCAAG	AY552528	(1)
<i>18S rRNA-r</i>	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	AY552528	
<i>LeACS2-f</i>	CGAGGATTCGGAGGTTCTAGGTGT	AY326958	(2)
<i>LeACS2-r</i>	GGTGAGGGAGGAATAGGTGACGAAAG	AY326958	
<i>LeACO1-f</i>	CAATCCAGGAAGTGATGCAG	X58273	(3)
<i>LeACO1-r</i>	TGGCTCTTTGGCTTGAAACT	X58273	
<i>LeACO4-f</i>	TGTCCCAAGCCAGACTTGAT	AB013101.1	(3)
<i>LeACO4-r</i>	TGCCATCTTGTTGAGCAATC	AB013101.1	
<i>LePT4-f</i>	GAAGGGGAGCCATTTAATGTGG	AY885651.1	(4)
<i>LePT4-r</i>	ATCGCGGCTTGTTTAGCATTC	AY885651.1	

(1) TYBURSKI et al., 2009; (2) ZHANG; YUAN; LENG, 2009; (3) ANSTEAD et al., 2009; (4) BALESTRINI et al., 2007.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Biomassa vegetal da parte aérea

A inoculação com *G. clarum* e a aplicação de AVG na concentração 10 µM não afetou significativamente a produção de biomassa nos mutantes hormonais de MT (teste Tukey, $p < 0,05$). Da mesma forma, a produção de biomassa não foi estatisticamente diferente entre os mutantes e o controle MT. Entretanto, a aplicação de AVG na concentração 100 µM reduziu significativamente ($p < 0,05$) a massa seca da parte aérea da planta (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Biomassa vegetal da parte aérea de plantas de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes superprodutor de etileno (*epi*) e deficientes em ácido abscísico (*not* e *sit*) inoculadas com *Glomus clarum*. Os dados são médias de 6 repetições. As barras representam o desvio padrão da média

3.2.2.2 Colonização micorrízica e funcionalidade da simbiose

A colonização micorrízica no mutante superprodutor de etileno *epi* e deficiente em ABA *not* foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle MT. Já o mutante *sit* apresentou redução significativa na taxa de colonização em relação aos demais genótipos. A aplicação de AVG na concentração de 10 µM resultou em aumento significativo de 1,6 vezes na colonização intrarradicular no mutante *epi* ($p < 0,05$), em relação ao *epi* sem AVG. A aplicação de AVG a 10 µM em *epi* recuperou a colonização intrarradicular aos níveis observados no MT ($p < 0,05$). Este aumento também foi observado para o mutante *sit*, entretanto a taxa de colonização continuou sendo significativamente reduzida em relação ao MT. Já para o mutante *not*, a aplicação de AVG a 10 µM não afetou estatisticamente a taxa de colonização micorrízica. Para todos os genótipos, a aplicação de AVG na concentração de 100 µM reduziu significativamente a colonização intrarradicular (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Porcentagem de colonização intrarradicar em tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes superprodutor de etileno (*epi*) e deficientes em ácido abscísico (*not* e *sit*) inoculados com *Glomus clarum*. Os dados são médias de 6 repetições. As barras representam o desvio padrão da média. A, B e C são usadas para comparar as médias dos diferentes genótipos dentro da mesma concentração de AVG; X, Y e Z são usadas para comparar as médias das diferentes concentrações de AVG dentro do mesmo genótipo. Médias seguidas se letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

A funcionalidade da simbiose, avaliada pela expressão do gene *LePT4*, o qual codifica um transportador de fosfato específico de MAs, foi avaliada para as raízes inoculadas tratadas com AVG na concentração de 10 μ M. O acúmulo de transcritos para este gene confirmou os resultados de colonização micorrízica. A expressão de *LePT4* nas raízes micorrizadas dos mutantes *epi*, *not* e *sit* foi fortemente reduzida em relação ao controle selvagem MT. Entretanto, quando AVG foi aplicado, o acúmulo de transcritos no mutante *epi* aumentou, chegando a ser estatisticamente igual ao observado em MT. Não foi observado aumento do acúmulo de transcritos de *LePT4* com a aplicação de AVG nos mutantes *not* e *sit* (Figura 3.4).

Figura 3.4 – Acúmulo diferencial de transcritos codificando um transportador de fosfato (*LePT4*) específico para MAs em raízes de tomateiro cv Micro-tom (MT) e dos mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) colonizadas por *Glomus clarum*. Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pela expressão do gene rRNA 18S. O AVG foi aplicado na concentração de 10 μ M

A quantificação de arbúsculos, vesículas, apressórios e hifas externas, determinada pelo método ampliado de interseções (*magnified intersections method*), demonstrou que todos os mutantes apresentaram uma quantidade significativamente menor ($p < 0,05$) de todas as estruturas micorrízicas avaliadas. Entretanto, com a adição de AVG a 10 μ M, a frequência de estruturas fúngicas no mutante *epi* não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) daquela observada em MT. A adição de AVG nos mutantes *not* e *sit* não alterou o desenvolvimento das estruturas fúngicas, quando comparado aos seus controles sem AVG (Tabela 3.2).

Raízes micorrizadas dos mutantes *epi*, *not* e *sit*, assim como o controle MT, foram examinadas utilizando-se microscopia de contraste de fase. O padrão de crescimento do fungo no interior das raízes foi indicativo da colonização tipo Arum, com arbúsculos e vesículas abundantes (Figura 3.5A). Entretanto, várias alterações morfológicas foram detectadas nos mutantes *epi*, *not* e *sit*. Presença de hifas extra- e intrarradiculares, sem apresentar desenvolvimento de arbúsculos e vesículas (Figura 3.5B) e ramificação anormal de hifas septadas (Figura 3.5C) foram observadas no

mutante *epi*. Infecção limitada pode ser observada no mutante *not* (Figura 3.5D) e formação incompleta de arbúsculos (Figura 3.5E) e abundância de hifas externas de *G. clarum* sem colonização intrarradicular (Figura 3.5F) pode ser observada no mutante *sit*.

Tabela 3.2 – Quantificação das estruturas fúngicas em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes superprodutor de etileno (*epinastic*) e deficientes em ABA (*notabilis* e *sitiens*) colonizadas por *Glomus clarum*

Genótipo	Tratamento		Tratamento	
	Controle	10 μ M AVG	Controle	10 μ M AVG
	Hifa externa		Arbúsculo	
Micro-Tom	52,8 $\pm$ 2,2 AX	51,2 $\pm$ 3,2 AX	94,5 $\pm$ 3,2 AX	92,0 $\pm$ 4,8 AX
<i>epinastic</i>	56,4 $\pm$ 1,8 AX	56,7 $\pm$ 1,5 AX	83,0 $\pm$ 4,4 AY	90,2 $\pm$ 2,4 BX
<i>notabilis</i>	42,4 $\pm$ 2,7 AY	44,5 $\pm$ 2,8 AY	81,0 $\pm$ 2,7 AY	85,0 $\pm$ 3,0 AY
<i>sitiens</i>	41,3 $\pm$ 2,3 AY	42,7 $\pm$ 2,5 AY	80,5 $\pm$ 2,6 AY	80,0 $\pm$ 1,9 AY
	Apressório		Vesícula	
	Controle	10 μ M AVG	Controle	10 μ M AVG
	Apressório		Vesícula	
Micro-Tom	16,2 $\pm$ 3,8 AX	15,9 $\pm$ 3,5 AX	21,5 $\pm$ 3,7 AX	20,9 $\pm$ 3,2 AX
<i>epinastic</i>	11,2 $\pm$ 2,7 AY	15,7 $\pm$ 3,2 BX	8,5 $\pm$ 2,6 AY	19,2 $\pm$ 3,2 BX
<i>notabilis</i>	10,3 $\pm$ 3,3 AY	11,4 $\pm$ 3,1 AY	7,9 $\pm$ 2,2 AY	7,8 $\pm$ 2,5 AY
<i>sitiens</i>	10,2 $\pm$ 1,8 AY	11,0 $\pm$ 2,1 AY	7,2 $\pm$ 1,7 AY	7,0 $\pm$ 1,9 AY

Os valores correspondem às médias de 6 repetições e de 100 leituras $\pm$ desvio padrão da média. A e B são usadas para comparar as médias na mesma linha; X e Y são usadas para comparar as médias na mesma coluna. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3.5 – Alterações morfológicas em raízes de genótipos de tomateiro inoculado com *Glomus clarum*. A. cultivar Micro-Tom, mostrando colonização externa e interna normal por *G. clarum*; B. Mutante *epinastic* com presença de hifas extra- e intrarradiculares, sem apresentar desenvolvimento de arbúsculos e vesículas; C. ramificação anormal de hifas septadas nas raízes do mutante *epinastic*; D. Mutante *notabilis* mostrando infecção limitada; E. Mutante *sitiens* com formação atípica de arbúsculos; F. Hifas externas de *G. clarum* sem colonização intrarradicular em raízes do mutante *sitiens*

3.2.2.3 Expressão diferencial de genes relacionados à via da biossíntese de etileno e do ácido abscísico

Indução significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de transcritos para o gene *LeACS2* foi observada nas raízes micorrizadas de MT sem aplicação de AVG, em relação ao controle não-inoculado. Entretanto, com a aplicação de AVG, o acúmulo de transcritos de *LeACS2* foi significativamente suprimido ($p < 0,05$) em MT (Figura 3.6). No mutante *epi*, supressão significativa ($p < 0,05$) foi observado somente na presença de AVG, em que *LeACS2* foi reprimido. Supressão significativa deste gene foi observada também no mutante *not*, tanto em raízes colonizadas por *G. clarum* ($p < 0,05$) quanto em raízes não-inoculadas ($p < 0,05$). No mutante *sit*, supressão no acúmulo de transcritos de *LeACS2* foi observada somente em raízes micorrizadas que tratadas com AVG ($p < 0,05$).

Figura 3.6 – Acúmulo diferencial de transcritos de ACC sintase (*LeACS2*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) colonizados por *Glomus clarum* (Gc). Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pelos níveis de transcritos do gene rRNA 18S. O AVG foi aplicado na concentração de 10 μ M. Ni, não-inoculado. (*) indica supressão e (**) indução significativa ($p < 0,05$) em relação ao MT não-inoculado

O acúmulo relativo de transcritos do gene *LeACO1* está apresentado na Figura 3.7. Os mutantes *epi*, *not*, assim como o controle MT apresentaram supressão significativa do acúmulo de transcritos de *LeACO1*, tanto em raízes micorrizadas quanto em raízes de plantas tratadas com AVG ($p < 0,05$). No mutante *sit* micorrizado, o acúmulo de transcritos de *LeACO1* foi significativamente maior (44 vezes) ($p < 0,05$) do nas raízes de *sit* micorrizadas e tratadas com AVG.

Figura 3.7 – Acúmulo diferencial de transcritos de ACC oxidase (*LeACO1*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) colonizados por *Glomus clarum* (Gc). Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pelos níveis de transcritos do gene rRNA 18S. O AVG foi aplicado na concentração de 10 μ M. Ni, não-inoculado. (*) indica supressão e (**) indução significativa ($p < 0,05$) em relação ao MT não-inoculado

O nível de transcritos de *LeACO4* em raízes micorrizadas de MT foi 7 vezes maior do que em raízes micorrizadas de MT tratadas com AVG ($p < 0,05$). O mutante *epi* apresentou aumento significativo no acúmulo de transcritos de *LeACO4* tanto em raízes micorrizadas tratadas com AVG, quanto em raízes não-inoculadas ($p < 0,05$). O acúmulo de transcritos de *LeACO4* nas raízes do mutante *sit* micorrizadas foi 29 vezes maior ($p < 0,05$) do que em raízes tratadas com AVG, nas quais o acúmulo de transcritos foi suprimido (Figura 3.8).

Figura 3.8 – Acúmulo diferencial de transcritos de ACC oxidase (*LeACO4*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) colonizados por *Glomus clarum* (Gc). Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pelos níveis de transcritos do gene rRNA 18S. O AVG foi aplicado na concentração de 10 μ M. Ni, não-inoculado. (*) indica supressão e (**) indução significativa ($p < 0,05$) em relação ao MT não-inoculado

O acúmulo de transcritos de *LeNCED* em raízes de diferentes genótipos de tomateiro está apresentado na Figura 3.9. Todos os genótipos apresentaram indução significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de transcritos em raízes micorrizadas, sendo que o mutante *sit* foi o que apresentou uma maior indução chegando a ser 3 vezes maior do que em MT. O mutante *epi* também apresentou aumento no acúmulo de transcritos de *LeNCED* ($p < 0,05$) em raízes micorrizadas tratadas com AVG, o qual foi 4 vezes maior do que as raízes micorrizadas sem AVG.

Figura 3.9 – Acúmulo diferencial de transcritos de 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (*LeNCED*) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes *epinastic* (*epi*), *notabilis* (*not*) e *sitiens* (*sit*) colonizados por *Glomus clarum* (Gc). Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pelos níveis de transcritos do gene rRNA 18S. O AVG foi aplicado na concentração de 10 μ M. Ni, não-inoculado. (*) indica supressão e (**) indução significativa ($p < 0,05$) em relação ao MT não-inoculado

3.2.3 Discussão

Neste estudo, foi investigado o efeito de etileno e ABA no estabelecimento de MA em tomateiro e o efeito da inoculação com *G. clarum* no acúmulo de transcritos que codificam enzimas chave na síntese de etileno e ABA.

A colonização intrarradicular por *G. clarum* nos mutantes *epi* e *not* foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle MT, sendo que *sit* foi o mutante menos susceptível à colonização do que os demais genótipos. A aplicação exógena de AVG a 10 μM , um inibidor da síntese de etileno, restaurou a colonização micorrízica em *epi* aos níveis observados em MT. Apesar da colonização micorrízica ter aumentado nos mutantes *not* e *sit* com a aplicação de AVG, as taxas de colonização continuaram sendo significativamente menores ($p < 0,05$) do que em MT. A colonização micorrízica em todos os genótipos em que foi aplicado AVG a 100 μM foi menor em relação aos demais tratamentos. É provável que esta concentração de AVG tenha sido tóxica para a planta, já que a biomassa da parte aérea da planta foi significativamente menor para todos os genótipos. Portanto, as análises de quantificação de estruturas micorrízicas e expressão de genes que codificam enzimas chaves das vias de biossíntese de etileno e ABA foram feitas utilizando-se AVG 10 μM .

Vários trabalhos já demonstraram que o etileno é considerado um inibidor da formação de MA (AZCÓN-AGUILAR; RODRIGUES-NAVARRO; BAREA, 1981; GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001; GEIL; GUINEL, 2002; ZSÖGÖN et al., 2008) e que, como observado neste trabalho, o mutante *epi* desenvolve MAs com alterações morfológicas (ZSÖGÖN et al., 2008) similares às alterações observadas em mutantes defectivos na formação de MA (BARKER et al., 1998; GAO; DELP; SMITH, 2001). Como a colonização fúngica intrarradicular foi totalmente restaurada em *epi* tratado com AVG, é possível que a redução da colonização pelo FMA observada no mutante *epi* seja causada pela resposta ao excesso de etileno nesse mutante. Além da quantificação das estruturas micorrízicas, a funcionalidade da simbiose, avaliada por meio da expressão do gene que codifica um transportador de fosfato específico de MAs (*LePT4*) (BALESTRINI et al., 2007), confirmou os resultados observados para a colonização

intrarradicular, demonstrando que, com a aplicação de AVG, o mutante *epi* restaura o estabelecimento da simbiose funcional.

A expressão dos genes *LeACS2* e *LeACO4* foi significativamente induzida ($p < 0,05$) nas raízes micorrizadas de MT, enquanto que em raízes micorrizadas de *epi*, não houve indução da expressão destes genes, sugerindo que genes envolvidos na biossíntese de etileno são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento de MAs. Com a aplicação de AVG, o acúmulo de transcritos de *LeACS2* foi suprimido tanto em MT quanto em *epi*, enquanto que o acúmulo de transcritos de *LeACO4* foi significativamente induzido em raízes não-micorrizadas de *epi* e raízes micorrizadas tratadas com AVG. Entretanto, o gene *LeACO1* foi significativamente reprimido tanto em raízes micorrizadas de MT quanto de *epi* tratadas ou não com AVG.

A via de síntese do etileno é bem estabelecida em plantas superiores (YANG; HOFFMAN, 1984) e o controle regulatório é alcançado em dois passos: a conversão de S-adenosil-metionina (SAM) em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) sob a ação da ACC sintase, e a conversão do ACC em etileno, CO_2 e HCN, pela ACC oxidase. Ambas as enzimas são codificadas por famílias multigênicas (ZAREMBINSKI; THEOLOGIS, 1994), possibilitando múltiplas respostas a diferentes condições ambientais ou associadas ao desenvolvimento da planta. Em tomate nove genes codificando ACS (*LeACS1A* e *B* a *LeACS8*) (OELLER et al., 1991; ROTTMANN et al., 1991; YIP et al., 1990) e seis genes codificando ACO (*LeACO1* – *LeACO6*) (BIDONDE et al., 1998) são conhecidos, e estes genes são diferencialmente regulados a nível de transcrição por desenvolvimento interno e resposta a estresses. De fato, não foram detectados transcritos de duas isoformas que codificam ACC sintases (*LeACS3* e *LeACS4*) nos genótipos estudados neste trabalho (dados não mostrados).

Os resultados sugerem que ACC oxidase possui um importante papel na regulação do desenvolvimento de MAs. Com a aplicação de AVG, o mutante *epi* recuperou totalmente a susceptibilidade à colonização por *G. clarum* em relação ao genótipo MT. Como o gene *LeACO4* foi induzido nas raízes micorrizadas de *epi* que receberam AVG, é possível que o fungo induza a expressão deste gene para seu estabelecimento e desenvolvimento na raiz. Como a função gênica no mutante *epi* é desconhecida (BARRY et al., 2001), é importante ressaltar que a mutação em *epi* pode

ser regulada via ACC oxidase, já que o gene *LeACO4* foi induzido nas raízes não micorrizadas de *epi*. Fica evidente que a regulação da síntese do etileno é importante para o estabelecimento de MAs, já que dois genes, *LeACS2* e *LeACO4*, que codificam enzimas chaves da biossíntese do etileno foram significativamente induzidas ($p < 0,05$) em raízes micorrizadas de MT.

Diferente dos resultados observados no mutante *epi*, o tratamento com AVG não restaurou o estabelecimento da simbiose nos mutantes *not* e *sit*. O acúmulo de transcritos de *LePT4* em MT e no mutante *epi* que receberam AVG chegou a ser 10 e 5 vezes maior do que os mutantes *not* e *sit* tratados com AVG, respectivamente. Estudos sobre o efeito de ABA no desenvolvimento de MA têm sido conduzidos principalmente através de medições do conteúdo desse hormônio em plantas micorrizadas. Alguns trabalhos demonstraram conteúdo aumentado de ABA nas folhas e raízes de *Zea mays* (DANNEBERG et al., 1992) e raízes de *Glycine max* (MURAKAMI-MIZUKAMI; YAMAMOTO; YAMAKI, 1991; MEIXNER et al., 2005) micorrizadas, em relação a plantas não-micorrizadas. Entretanto, colonização de *Bouteloua gracilis* com FMA resultou em diminuição do conteúdo de ABA em folhas e não alteração do conteúdo de ABA nas raízes (ALLEN; MOORE; CHRISTENSEN, 1982). ABA também tem sido detectado nas hifas fúngicas em concentrações mais altas do que em raízes (ESCH et al., 1994).

A via de sinalização de ABA interage antagonicamente com a via de sinalização do etileno, e vice-versa, para modular o desenvolvimento da planta (BEAUDOIN et al., 2000; GHASSEMIAN et al., 2000) e resistência à patógenos (ANDERSON et al., 2004). Foi demonstrado por Herrera-Medina e colaboradores (2007) que a redução na colonização por *Glomus intraradices* no mutante *sit* se deve, pelo menos em parte, ao acúmulo de etileno. A aplicação de STS (tiosulfato de prata) demonstrou que o bloqueio da percepção do etileno aumentou o desenvolvimento da MA, evidenciando que a percepção é essencial para a formação da simbiose (HERRERA-MEDINA et al., 2007). De fato, o acúmulo de transcritos de duas ACC oxidases (*LeACO1* e *LeACO4*) foi induzido significativamente ($p < 0,05$) em raízes micorrizadas do mutante *sit* e suprimido quando a síntese do etileno foi bloqueada. Já para o mutante *not*, não foi

observada indução no acúmulo de transcritos tanto para raízes micorrizadas quanto para as raízes que receberam AVG.

O mutante *not* possui uma mutação nula no gene *LeNCED1* que codifica a enzima 9-cisepoxicarotenoide dioxigenase (NCEDs). NCED pertence à família de dioxigenases que cliva carotenóides e catalisa um passo crítico na regulação da biossíntese de ABA em plantas superiores. Tem sido proposto que 9-cis-neoxantina e 9-cis-violoxantina são precursores do ABA (LI; WALTON, 1990; ROCK; ZEEVAART, 1991; PARRY; HORGAN, 1992). A clivagem destas moléculas por NCED leva a formação de xantoxina que é convertida a aldeído-ABA por uma álcool desidrogenase ABA2. Finalmente uma aldeído oxidase (AAO) transforma aldeído-ABA em ABA bioativo (SCHWARTZ et al., 1997; TAYLOR et al., 2005). O genótipo *sit* possui uma mutação na enzima AAO (CORNISH; ZEEVAART, 1988). A mutação em *not* é menos drástica do que a observada em *sit*, o qual apresenta um fenótipo mais característico de uma severa deficiência em ABA (germinação de sementes vivíparas) e também superprodução de etileno (epinastia da folha). Se a redução na micorrização observada em mutantes de tomate deficientes em ABA (HERRERA-MEDINA et al., 2007) está relacionada com sua incapacidade de sintetizar ABA, e se este efeito é dependente da produção de etileno foi abordado por Rodriguez et al. (2010). O mutante *sit* mostrou uma grande redução na colonização fúngica, associada com sua incapacidade de biossíntese de ABA. Já o mutante *not* foi menos afetado na sua capacidade de formação de MA e manteve níveis normais de ABA. Estes autores sugerem que a redução na micorrização em raízes do mutante *sit* está diretamente associada com sua deficiência na biossíntese de ABA, e o acúmulo de etileno, como uma consequência da deficiência de ABA nos mutantes, afeta primariamente os níveis de colonização intrarradicular (RODRIGUEZ et al., 2010).

Os genes que codificam ACC oxidase (*LeACO1* e *LeACO4*) foram induzidos no mutante *sit*, sendo que a indução no acúmulo de transcritos de *LeACO4* foi cerca de 4 vezes maior do que *LeACO1*. Já nas raízes micorrizadas de *sit* que receberam AVG, o acúmulo desses transcritos foi suprimido. Como demonstrado por Sharp et al. (2000), a deficiência em ABA causa uma superprodução de etileno e é provável que esta superprodução seja pelo aumento da expressão de ACC oxidase. No mutante *not* não

foi observado aumento nos níveis de transcritos dos genes envolvidos na biossíntese do etileno estudados, sugerindo que as diferenças na severidade da deficiência de ABA atuam no desenvolvimento da micorriza, o que corrobora os resultados observados por Rodriguez et al. (2010).

O acúmulo de transcritos de *LeNCED*, que codifica a enzima chave da via de biossíntese de ABA, foi significativamente induzido ($p < 0,05$) em todos os genótipos avaliados, demonstrando que, assim como o etileno, ABA também exerce um efeito no desenvolvimento da MA. No mutante *epi*, indução no acúmulo de transcritos também foi observada nas raízes micorrizadas que receberam AVG. Como mencionado anteriormente o genótipo *not* possui uma mutação nula no gene NCED, e o mutante *sit* o gene AAO, e a presença do FMA induziu acúmulo de transcritos destes gene em ambos os mutantes. É possível que esta indução seja devida ao acúmulo de etileno observado nestes mutantes, já que a via de sinalização de ABA e etileno atuam antagonicamente (BEAUDOIN et al., 2000; GHASSEMIAN et al., 2000).

Nos mutantes *sit* e *not*, a produção de estrigolactonas é significativamente reduzida, se comparada com a planta selvagem (LÓPEZ-RÁEZ et al., 2010). Estrigolactonas são consideradas uma nova classe de hormônios vegetais (GOMEZ-ROLDAN et al., 2008; UMEHARA et al., 2008), que além de sua função de sinalização endógena, são exsudadas na rizosfera agindo como um sinal para estimular a ramificação das hifas dos FMAs (AKIYAMA; MATSUZAKI; HAYASHI; 2005) e germinação de sementes de plantas parasitas (BOUWMEESTER et al., 2003). Além do efeito do ABA durante o desenvolvimento da micorriza demonstrado neste trabalho e por Herrera-Medina et al. (2007) e Rodriguez et al. (2010), é possível que a colonização micorrízica reduzida observada em *not* e *sit* possa também estar associada a uma redução na produção de estrigolactonas.

A relação entre as vias de sinalização que existe entre etileno e ABA pode regular diferencialmente diversos processos, assim como o desenvolvimento de MAs. Como sugerido em um estudo comparativo dos transcriptomas de raízes micorrizadas de tomateiro e do mutante *sit*, a diminuição na formação da MA em *sit* pode estar associada à indução de genes relacionados à defesa vegetal e modificação da parede celular (GARRIDO et al., 2010). Entretanto, dois genes induzidos nas raízes

micorrizadas de *sit* (*Endo-Q* e β -*Exp*) foram induzidos também com a aplicação exógena de etileno, mostrando que a via do etileno pode ter relevância na regulação da expressão de genes de defesa e modificação da parede celular, os quais parecem ser os genes com maiores alterações de expressão em raízes de mutantes micorrizadas deficientes em ABA. O estudo do desenvolvimento da MA em um duplo mutante *epi:sit*, poderia elucidar várias questões da relação entre as vias de biossíntese destes hormônios no estabelecimento e desenvolvimento da simbiose.

3.3 Conclusões

Este trabalho mostrou que etileno e ABA exercem importantes funções durante o desenvolvimento de MAs. A colonização intrarradicular de *G. clarum* nos mutantes *epi* e *not* foi significativamente reduzida quando comparada com o controle MT, sendo que o mutante *sit* foi o menos susceptível à colonização em relação aos demais genótipos. A aplicação de um inibidor da síntese de etileno restaurou completamente a colonização em *epi*, mas não nos mutantes deficientes em ABA. A expressão do gene *LePT4*, específico da simbiose, confirma os resultados de colonização. Os genes que codificam enzimas chave na biossíntese do etileno, *LeACS2* e *LeACO4*, foram reguladas positivamente pelo FMA, e a provável restauração no desenvolvimento da MA observada em *epi* que recebeu AVG, provavelmente se faz via ACC oxidase (*LeACO4*). Além disso, os genes que codificam ACC oxidase (*LeACO1* e *LeACO4*) foram regulados positivamente em *sit*, mostrando que a superprodução de etileno observada neste mutante pode ser via ACC oxidase. Por fim, o gene que codifica a enzima chave da via de biossíntese de ABA (*LeNCED*) foi positivamente regulado em todos os genótipos micorrizados, demonstrando um efeito do etileno na regulação de *LeNCED*.

Referências

ALLEN, M.F.; MOORE, T.S.; CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic-acid in the host plant. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 60, n.4, p. 468-471, 1982.

AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, n. 7043, p. 824-827, 2005.

ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M.; DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3460-3479, 2004.

ANSTEAD, J.; SAMUEL, P.; SONG, N.; WU, C.; THOMPSON, G.A.; GOGGIN, F. Activation of ethylene-related genes in response to aphid feeding on resistant and susceptible melon and tomato plants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Malden, v. 134, n. 2, p. 170-181, 2010.

AZCÓN-AGUILAR, C.; RODRIGUES-NAVARRO, D.N.; BAREA, J.M. Effects of ethrel on the formation and responses to VA mycorrhiza in *Medicago* and *Triticum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 461-468, 1981.

BALESTRINI, R.; GÓMEZ-ARIZA, J.; LANFRANCO, L.; BONFANTE, P. Laser Microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v. 20, n. 9, p. 1055-1062, 2007.

BARKER, S.J.; STUMMER, B.; GAO, L.; DISPAIN, I.; O'CONNOR, P.J.; SMITH, S.E. A mutant in *Lycopersicon esculentum* Mill. With highly reduced VA mycorrhizal colonization: isolation and preliminary characterization. **The Plant Journal**, Oxon, v. 15, n. 6, p. 791-797, 1998.

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

BEAUDOIN, N.; SERIZET, C.; GOSTI, F.; GIRAUDAT, J. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1103-1115, 2000.

BIDONDE, S.; FERRER, M.A.; ZEGZOUTI, H.; RAMASSAMY, S.; LATCHE, A.; PECH, J.C.; HAMILTON, A.J.; GRIERSON, D.; BOUZAYEN, M. Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 253, n. 1, p. 20-26, 1998.

BOUWMEESTER, H.J.; MATUSOVA, R.; SUN, Z.K.; BEALE, M.H. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 358-364, 2003.

BURBIDGE, A.; GRIEVE, T.M.; JACKSON, A.; THOMPSON, A.; McCARTY, D.R.; TAYLOR, I.B. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize *Vp14*. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 427-431, 1999.

CORNISH, K.; ZEEVAART, J.A.D. Phenotypic expression of wild-type tomato and three wilted mutants in relation to abscisic acid accumulation in roots and leaflets of reciprocal grafts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, n. 1, p. 190-194, 1988.

DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea-mays* L). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 141, n. 1, p. 33-39, 1993.

ESCH, H.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDERPOETSCH, H.; BOTHE, H. Demonstration of abscisic-acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Plant Science**, Clare, v. 99, n. 1, p. 9-16, 1994.

GARRIDO, J.M.G.; MORCILLO, R.J.L.; RODRIGUEZ, J.A.M.; BOLE, J.A.O. Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 23, n. 5, p. 651-664, 2010.

GAO, L.L.; DELP, G.; SMITH, S.E. Colonization patterns in a mycorrhiza-defective mutant tomato vary with different arbuscular-mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 151, p. 477-491, 2001.

GHASSEMIAN, M.; NAMBARA, E.; CUTLER, S.; KAWAIDE, H.; KAMIYA, Y.; McCOURT, P. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 7, p. 1117-1126, 2000.

GEIL, R.D.; GUINEL, F.C. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 2, p. 114-119, 2002.

GEIL, R.D.; PETERSON, R.L.; GUINEL, F.C. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n. 3, p. 137-143, 2001.

GENRE, A.; CHABAUD, M.; FACCIO, A.; BARKER, D.G.; BONFANTE, P. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. **Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 5, p. 1407-1420, 2008.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, New York, v. 84, p. 489-500, 1980.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P.B.; PUECH-PAGES, V.; DUN, E.A.; PILLOT, J.P.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.C.; BOUWMEESTER, H.; BECARD, G.; BEVERIDGE, C.A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S.F. Strigolactone inhibition of shoot branching. **Nature**, London, v. 455, n. 7210, p. 189-U22, 2008.

GUINEL, F.C.; GEIL, R.D. A model for the development of the rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses in legumes and its use to understand the roles of ethylene in the establishment of these two symbioses. **Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 80, n. 7, p. 695-720, 2002.

GRUNWALD, U.; NYAMSUREN, O.; TARNASLOUKHT, M.; LAPOPIN, L.; BECKER, A.; MANN, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KRAJINSKI, F.; FRANKEN, P. Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbusculo development-related expression profile. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 4, p. 553-566, 2004.

GUETHER, M.; BALESTRINI, R.; HANNAH, M.; HE, J.; UDVARDI, M.M.; BONFANTE, P. Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicas*. **New Phytologist**, Malden, v. 182, n. 1, p. 200-212, 2009.

HAUSE, B.; MROSK, C.; ISAYENKOV, S.; STRACK, D. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 101-110, 2007.

HERRERA-MEDINA, M.J.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H.; BOTE, J.A.O.; GARRIDO, J.M.G. Absciscic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, Oxon, v. 175, n. 3, p. 554-564, 2007

HOHNJEC, N.; VIEWEG, M.E.; PUHLER, A.; BECKER, A.; KUSTER, H. Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different Glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 4, p. 1283-1301, 2005.

ISHII, T.; SHRESTHA, Y.H.; MATSUMOTO, I.; KADOYA, K. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 65, n. 3, p. 525-529, 1996.

LI, Y.; WALTON, D.C. Violaxanthin is an abscisic-acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 3, p. 551-559, 1990.

LIU, J.Y.; MALDONADO-MENDOZA, I.; LOPEZ-MEYER, M.; CHEUNG, F.; TOWN, C.D. HARRISON, M.J. Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. **Plant Journal**, Oxon, v. 50, n. 3, p. 529-544, 2007.

LOPEZ-RAEZ, J.A.; KOHLEN, W.; CHARNIKHOVA, T.; MULDER, P.; UNDAS, A.K.; SERGEANT, M.J.; VERSTAPPEN, F.; BUGG, T.D.H.; THOMPSON, A.J.; RUYTER-SPIRA, C.; BOUWMEESTER, H. Does abscisic acid affect strigolactone biosynthesis? **New Phytologist**, Malden, v. 187, n. 2, p. 343-354, 2010.

McGONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, New York, v. 115, p. 495-501, 1990.

MEIXNER, C.; LUDWIG-MULLER, J.; MIERSCH, O.; GRESSHOFF, P.; STAEHELIN, C.; VIERHEILIG, H. Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant *nts1007*. **Planta**, New York, v. 222, n. 4, p. 709-715, 2005.

MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 27, n. 5, p. 697-701, 1989.

MURAKAMI-MIZUKAMI, Y.; YAMAMOTO, Y.; YAMAKI S. Analyses of indole acetic-acid and abscisic-acid contents in nodules of soybean plants bearing VA mycorrhizas. **SOIL Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 37, n. 2, p. 291-298, 1991.

OELLER, P.W.; WONG, L.M.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, Washington, v. 254, n. 5030, p. 437-439, 1991.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews**, London, v. 6, p. 763-775, 2008.

PASZKOWSKI, U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. **New Phytologist**, Oxon, v. 172, n. 1, p. 35-46, 2006.

PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 308-316, 2009.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato 'Micro-Tom' model system. **Plant Methods**, London, v. 6, n. 23, 2010.

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

PARRY, A.D.; HORGAN, R. Absciscic acid biosynthesis in roots .I. The identification of potential abscísico acid precursors, and other carotenoids. **Planta**, New York, v. 187, n. 2, p. 185-191, 1992.

REQUENA, N.; SERRANO, E.; OCÓN, A.; BREUNINGER, M. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 33-40, 2007.

ROCK, C.D.; ZEEVAART, J.A.D. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 17, p. 7496-7499, 1991.

RODRIGUEZ, J.A.M.; MORCILLO, R.L.; VIERHEILIG, H.; OCAMPO, J.A.; LUDWIG-MULLER, J.; GARRIDO, J.M.G. Mycorrhization of the *notabilis* and *sitiens* tomato mutants in relation to absciscic acid and ethylene contents. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, n. 8, p. 606-613, 2010.

ROTTMANN, W.H.; PETER, G.F.; OELLER, P.W.; KELLER, J.A.; SHEN, N.F.; NAGY, B.P.; TAYLOR, L.P.; CAMPBELL, A.D.; THEOLOGIS, A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. **Journal of Molecular Biology**, England, v. 222, n. 4, p. 937-961, 1991.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual III. S.1. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. 1 v.

SCHWARTZ, S.H.; TAN, B.C.; GAGE, D.A.; ZEEVAART, J.A.D.; McCARTY, D.R. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. **Science**, Washington, v. 276, n. 5320, p. 1872-1874, 1997.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 350, p. 1575-1584, 2000.

SICILIANO, V.; GENRE, A.; BALESTRINI, R.; CAPPELLAZZO, G.; DEWIT, P.J.G.M.; BONFANTE, P. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 3, p. 1455-1466, 2007.

SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis** 2nd ed. London: Academic Press, 1997. 456 p.

SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. Amsterdam: Academic Press, 2008. 769 p.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.1, p. 231-2331, 1975.

TAYLOR, I.B.; SONNEVELD, T.; BUGG, T.D.H.; THOMPSON, A.J. Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 24, n. 4, p. 253-273, 2005.

TAYLOR, I.B.; LINFORTH, R.S.T.; ALNAIEB, R.J.; BOWMAN, W.R.; MARPLES, B.A. The wilted tomato mutants *flacca* and *sitiens* are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 11, n. 8, p. 739-745, 1988.

TYBURSKI, J.; DUNAJSKA, K.; MAZUREK, P.; PIOTROWSKA, B.; TRETYN, A. Exogenous auxin regulates H₂O₂ metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 31, p. 249-260, 2009.

UMEHARA, M.; HANADA, A.; YOSHIDA, S.; AKIYAMA, K.; ARITE, T.; TAKEDA-KAMIYA, N.; MAGOME, H.; KAMIYA, Y.; SHIRASU, K.; YONEYAMA, K.; KYOZUKA, J.; YAMAGUCHI, S. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. **Nature**, London, v. 455, n. 7210, p. 195-U29, 2008.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHE, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 5004-5007, 1998.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 35, p. 155-189, 1984.

YIP, W.K.; DONG, J.G.; KENNY, J.W.; THOMPSON, G.A.; YANG, S.F. Characterization and sequencing of the active-site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 20, p. 7930-7934, 1990.

ZAREMBINSKI, T.I.; THEOLOGIS, A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. **Plant Molecular Biology**, Dordrech, v. 26, n. 5, p. 1579-1597, 1994.

ZHANG, M.; YUAN, B.; LENG, P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1579-1588, 2009.

ZSÖGÖN A., LAMBAIS, M.R.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O.; PERES, L.E.P. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 3, p. 259-267, 2008.