Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Desenvolvimento de micorriza arbuscular em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*) e superprodutor de etileno (*epinastic*)

Joze Aparecida Marciano Corrêa

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

Piracicaba
2010

Joze Aparecida Marciano Corrêa
Bióloga

Desenvolvimento de micorriza arbuscular em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*) e superprodutor de etileno (*epinastic*)

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

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

Piracicaba
2010

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

Corrêa, Joze Aparecida Marciano
Desenvolvimento de micorriza arbuscular em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*) e superprodutor de etileno (*epinastic*) / Joze Aparecida Marciano Corrêa. - - Piracicaba, 2010.
64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

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

CDD 635.642
C824d

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

Aos meus pais, João e Zelinda,

Pelo infinito amor e apoio nas realizações dos meu sonhos.

Sem os seus ensinamentos eu não conseguiria.

DEDICO

"Não deixe que a saudade sufoque que a rotina acomode que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que esperando
porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu."

(Luiz Fernando Veríssimo)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Coordenação do PPG de Solos e Nutrição de Plantas e à ESALQ pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao CNPQ pela bolsa concedida, durante esses longos 2 anos.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, pela orientação e oportunidade.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres, pela disponibilidade do material e pelos esclarecimentos das diversas dúvidas.

Em especial a Giselle Gomes que em breve vai se tornar a senhora Cury, pela infinita ajuda na elaboração deste trabalho, pela paciência e generosidade, o meu eterno obrigado!

Ao Marcelo Lattarulo, Rogério Falleiros e Daniele Scotton, muito obrigada pelos esclarecimentos das infinitas dúvidas, pela ajuda e disposição.

As queridas amigas e segunda família Maria Marta, Marina e Maria Cecília, pela amizade, carinho, risadas e acima de tudo respeito.

Ao meu amor, Marcio Andrade, pelo carinho, dedicação, paciência, pelas infinitivas tentativas de me fazer rir e enxergar a vida de um jeito melhor e por estar sempre ao meu lado.

A minha família que amo tanto, em especial aos meus pais João e Zelinda, que sempre acreditaram em mim, investiram e pelo infinito amor. Aos meus irmãos João Paulo, Carlos e Francis e as minhas queridas sobrinhas Ana Paula e Ana Júlia, que são tudo para mim.

Aos queridos amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular, Adriano, Alice, Elisa, Gisele Nunes, Giselle uai, Kelly, Rafael, Winston, Silvia, Sandra, Maryeimy, Vivian, Rafael V. e Eder, pela troca de experiências na bancada, pela paciência, pelos bons momentos alegres que com certeza ajudaram a encarar as dificuldades do dia a dia.

A minha querida amiga Alice, pois não tenho palavras para agradecer a sua amizade e carinho, (estamos juntas) você vai longe pretinha!

As amigas que encontrei em Piracicaba, Ligia, Maria Eugenia, Christine, Fabiana e Layanne.

Aos eternos amigos biólogos da UNIMEP, em especial, a Maria Andréia Moreno, Márcia e Vanessa, pelos bons momentos e pela eterna amizade.

Aos queridos amigos de Itu, Adriana, Maria Alice, Thaise e Gustavo, desculpa pela ausência nos momentos em que vocês precisaram, mas nunca me esqueci de vocês, que saudades.....

Aos técnicos de laboratório, Wladimir, Denise e Fernando, muito obrigada por estarem sempre dispostos para ajudar.

Enfim, a todos que de alguma maneira ajudaram na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 Micorrizas Arbusculares 15
2.2 Envolvimento de hormônios vegetais no desenvolvimento de MAs 19
2.3 Comunicaçao cruzada entre vias de sinalização através de diferentes hormônios 22
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 Materiais biológicos 25
3.2 Instalação do experimento e condições de crescimento 25
3.3 Tratamento do genótipo *jai1-1* com metil jasmonato exógeno 27
3.4 Determinação do efeito do tratamento das sementes com MeJA na micorrização 28
3.5 Triagem fenotípica dos mutantes *epijai1* 29
3.6 Triagem genotípica dos mutantes *epijai1* 29
3.7 Reação da Polimerase em cadeia (PCR) 30
3.8 Avaliação da colonização micorrízica intrarradicular 30
3.9 Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de etileno e ácido jasmônico 31
3.9.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA 31
3.9.2 PCR-quantitativa (*qPCR*) 32
3.9 Análises Estatísticas 33
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO 35
4.1 Triagem fenotípica 35
4.2 Triagem genotípica 36
4.3 Colonização micorrizica intrarradicular 37
4.4 *Real Time quantitative PCR* 43
4.4.1 Efeitos da colonização por FMAs 44
4.4.1.1 Genes da via de biossíntese do ácido jasmônico (OPR3 e AOC) 44

4.4.1.2 Genes da via de biossíntese do etileno 47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 53
REFERÊNCIAS 55

RESUMO

Desenvolvimento de micorriza arbuscular em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*) e superprodutor de etileno (*epinastic*)

Micorrizas arbusculares (MAs) são simbioses mutualistas formadas entre fungos do solo e a maioria das plantas terrestres, principalmente angiospermas. Esta simbiose pode trazer uma série de benefícios para o hospedeiro vegetal, como uma maior absorção de fosfato, um aumento na tolerância ao estresse abiótico e biótico, e resistência a agentes patogênicos, resultando numa melhor adaptação ao meio. É possível que hormônios vegetais estejam envolvidos em eventos de sinalização entre fungos micorrízicos arbusculares e plantas hospedeiras, durante os processos de colonização das raízes e de desenvolvimento dos arbúsculos. Recentes estudos têm demonstrado que durante o estabelecimento da simbiose, ocorre uma reprogramação da expressão de um grande número de genes, e que essas alterações na expressão gênica podem estar associadas a alterações dos níveis de hormônios nas plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de MAs em mutantes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*), superprodutor de etileno (*epi*) e duplo mutante *epijai1* inoculados com *Glomus clarum* em condições de baixa concentração de fósforo no substrato, e a expressão de genes relacionadas à biossíntese do ácido jasmônico (AJ) (OPR3 e AOC) e do etileno (ET) (ACO4 e ACS2). O mutante *jai1-1* não apresentou colonização intrarradicular e o acúmulo de transcritos tanto para a via de biossíntese do AJ como do ET foi relativamente menor do que o controle MT o que sugere a importância do AJ para o desenvolvimento da simbiose.O mutante *epi* e o duplo mutante apresentaram colonização intraradicular reduzida em relação ao controle MT. O acúmulo de transcritos dos genes da via do ET (ACO4 e ACS2) e do AJ (OPR3 e AOC) foi maior no mutante *epi.* A insensibilidade ao AJ presente no duplo mutante não impediu o acúmulo de transcritos para as vias de biossíntese do AJ e do ET, o que sugere uma relação sinérgica entre os hormônios vegetais no estabelecimento da simbiose.

Palavras-chave: Fungos micorrízicos arbusculares; Hormônios vegetais; Ácido jasmônico; Etileno; Micro-tom; Mutante

ABSTRACT

Development of arbuscular mycorrhizal in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) insensitive to jasmonic acid (*jai1-1*) and ethylene over producer (*epinastic*)

Arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses are formed between mutualistic soil fungi and most land plants, particularly angiosperms. This symbiosis can bring many benefits to the host plant, such as increased absorption of phosphate, an increase in tolerance to abiotic and biotic stress, and resistance to pathogens, resulting in better adaptation to the environment. It's possible that plant hormones are involved in signaling events between mycorrhizal fungi and host plants during the processes of colonization of roots and development of arbuscules. Recent studies have shown that during the establishment of symbiosis, there is a reprogramming of the expression of a large number of genes, and that these changes in gene expression may be associated with altered levels of hormones in plants. The aim of this study was to evaluate the development of MA in mutants of tomato cv Micro-Tom (MT) insensitive to jasmonic acid (*jai1-1*), ethylene overproducer (*epi*) and double mutant *epijai1* inoculated with *Glomus clarum* under low phosphorus concentration in substrate, and the expression of genes related to biosynthesis of jasmonic acid (JA) (and OPR3 AOC) and ethylene (ET) (ACO4 and ACS2). *Jai1-1* mutant showed no intraradical colonization and the accumulation of transcripts for both the biosynthesis of JA and ET was less than the control MT suggesting the importance of JA for the development of *epi* and double mutant symbiosis. The mutant *epi* and the double mutant showed reduced intraradical colonization when compared to the control MT. The transcript accumulation of the ET (ACO4 and ACS2) and JA (OPR3 and AOC) genes was higher in the mutant *epi*. The insensitivity to the JA in this double mutant did not prevent the accumulation of transcripts for the biosynthetic pathways of JA and ET, suggesting a synergistic relationship between plant hormones for the establishment of symbiosis.

Keywords: Mycorrhizal fungi, Plant hormones; Jasmonic acid; Ethylene; Micro-Tom; Mutant

1 INTRODUÇÃO

Micorriza arbuscular (MA) é uma simbiose mutualista formada entre fungos Glomeromycota e a maioria das plantas terrestres, principalmente angiospermas. Os fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) colonizam os tecidos vegetais inter- e intracelularmente e hifas intracelulares se diferenciam em arbúsculos. Através dos arbúsculos ocorre uma troca bi-direcional de nutrientes entre FMA e planta. O principal beneficio das MAs é a maior aquisição de nutrientes minerais (principalmente fosfato e zinco) (SCHUBLER et al., 2001; SMITH; READ, 1997).

Além da troca de nutrientes, vários estudos têm demonstrado que esta simbiose pode conferir outros benefícios, como a resistência a microrganismos patogênicos, aumento do sucesso reprodutivo e crescimento da planta, capacidade de superar estresses abióticos, como estresses hídricos, altas temperaturas, salinidade e acidez do solo (ASCON-AGUILAR; BAREA, 1996; GANGE, 2001; LINDERMAN et al., 2000; CAVAGNARO et al., 2001; MARULANDA et al., 2003; PORCEL et al., 2004; RUIZ-LOZANO et al., 2001; SMITH et al., 2004; POZO; ASCON-AGUILAR, 2007).

A compatibilidade entre as raízes da planta hospedeira e os FMAs é um processo altamente regulado e coordenado, o que requer um reconhecimento recíproco dos simbiontes. Esse reconhecimento ocorre provavelmente através da troca de sinais difusíveis ou interações diretas entre as células, resultando em modificações moleculares em ambos os organismos e controle do desenvolvimento da simbiose (LAMBAIS, 2006; KIRIACHECK et al., 2009).

Os eventos de sinalização que ocorrem em MAs não são conhecidos, mas acredita-se que o reconhecimento de um molécula sinal produzida pelo fungo resulte em alterações nos níveis de alguns hormônios vegetais e consequente alteração da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento e controle da simbiose (GADKAR et al., 2001; LIU et al., 2003).

Os hormônios vegetais podem agir como mensageiros secundários no processo de sinalização entre plantas e microrganismos e afetar a regulação de genes de defesa vegetal e genes regulatórios (CHEN et al. 2002).

Ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET), e ácido abscísico (ABA) desempenham um papel fundamental na transdução de sinais em interações planta-patógeno, mas pouco se sabe sobre seu envolvimento em MAs . (BLILOU et al., 1999; LUDWIG, 2000; HERRERA-MEDINA et al., 2003; HAUSE et al., 2007; GARCIA-GARRIDO et al., 2008; RIEDEL et al., 2008; PIETERSE et al., 2009).

Tem sido proposto que o balanço de fitohormônios em plantas micorrizadas poderia estar envolvido na regulação do crescimento fúngico intrarradicular, através da expressão diferencial de genes de defesa vegetal (LAMBAIS e MEHDY, 1995).

Devido as especulações sobre a importância dos hormônios vegetais estarem envolvidos no processo de sinalização e desenvolvimento das MAs, alguns trabalhos com a utilização de hormônios vegetais estão sendo desenvolvidas no Laboratório de Microbiologia Molecular, Departamento de Ciência do Solo, ESALQ, -USP.

Costa et al. (2000) observaram que a aplicação exógena do ácido salicílico no solo inibe a atividade de β-1,3-glucanases e aumenta a atividade de quitinases nas raízes de feijoeiro. Os resultados sugerem que o ácido salicílico regularia a colonização intrarradicular, com atividade indutora nas quitinases, as quais poderiam degradar as hifas dos fungos micorrizicos arbusculares.

Zsögön et al. (2008) utilizaram plantas mutantes de tomateiro superprodutor de eitleno (*epinastic*) e outro insensível ao etileno (*never ripe*) em uma mesma base genética (cv Micro-Tom), colonizados com *Glomus clarum*. Os resultados sugerem que altas concentrações de etileno podem inibir a colonização, porém em baixas concentrações pode ocorrer o estabelecimento da simbiose.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes de tomateiro, insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*), superprodutor de etileno (*epi*), e no duplo mutante *epijai1*, para determinar se a interação desses hormônios pode ter algum papel na regulação do crescimento fúngico intrarradicular em MAs. Para isso foram feitas avaliação da colonização intrarradicular nos diferentes mutantes e análise de expressão de genes relacionados a via de biossíntese do etileno e do ácido jasmônico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micorrizas Arbusculares

As micorrizas arbusculares (MAs) são simbioses mutualistas obrigatórias entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), pertencentes ao filo Glomeromycota (SCHUBLER et al., 2001) e mais de 80% de espécies vegetais, principalmente as angiospermas (SMITH; READ, 1997).

O desenvolvimento de simbiose entre os FMAs e as plantas tem sido considerada como uma estratégia de sucesso que permitiu a colonização dos ambientes terrestres pelas plantas no inicio do processo evolutivo. Tem sido demonstrado através da análise de registros fósseis que as MAs surgiram a mais de 400 milhões de anos (REINHARDT, 2007; SIMITH; READ, 2008).

O principal beneficio das MAs é a maior aquisição de nutrientes minerais principalmente aqueles de baixa mobilidade no solo, como fósforo e zinco. Além da maior aquisição de nutrientes, vários estudos têm demonstrado que a simbiose pode conferir outros benefícios, como a maior tolerância a microrganismos patogênicos (ASCON-AGUILAR; BAREA, 1996; GANGE, 2001). Aumento do sucesso reprodutivo e crescimento da planta (LINDERMAN et al., 2000), maior tolerância a estresses hídricos, altas temperaturas, salinidade e acidez do solo (CAVAGNARO et al., 2001; MARULANDA et al., 2003; PORCEL et al., 2004; RUIZ-LOZANO et al., 2001; SMITH et al., 2004; POZO e ASCON-AGUILAR, 2007),

O desenvolvimento de MAs é um processo altamente regulado e coordenado, o que requer um reconhecimento recíproco de sinais moleculares e complexos sistemas de transdução de sinais (LAMBAIS, 2006; KIRIACHECK et al., 2009).

O desenvolvimento de MAs tem início com a germinação dos esporos no solo. Este processo não depende de sinais moleculares vegetais. Porém, a presença de composto voláteis na rizosfera como o CO_2 podem estimular o crescimento do tubo germinativo de FMAs, indicando que o fungo pode perceber e responder aos componentes presentes na rizosfera (NAIR et al., 1991; GIANINAZZI-PEARSON, 1996; HARRISSON, 2005).

Buée et al.(2000) demonstraram que as hifas dos FMAs apresentam uma intensa ramificação nas proximidades das raízes da planta hospedeira, sugerindo a existência de moléculas sinalizadoras que estimulam a ramificação das hifas nos exudatos de plantas hospedeiras, vários compostos flavonóides encontrados nos exudatos radiculares podem estimular a germinação de esporos, crescimento do tubo germinativo e colonização intrarradicular. No entanto, foi demonstrado, usando mutantes de milho incapazes de sintetizar flavonóides, que esses compostos não são essenciais para o desenvolvimento da simbiose (BÉCARD et al., 1995).

Recentemente, um fator de ramificação (*Branching Factor)* foi isolado de raízes de *Lotus japonicus* e identificado como uma estrigolactona, pertencente ao grupo de lactonas de sesquiterpenos (AKIYAMA et al., 2005). Essa molécula é capaz de induzir a ramificação das hifas de *Gigaspora margarita*, mas sua essencialidade para o desenvolvimento da simbiose não foi determinada.

Após a germinação do esporo a hifa infectiva cresce através da rizosfera e encontra a superfície da raiz, na qual forma uma estrutura de penetração denominada apressório. Os sinais moleculares que ativam a diferenciação da hifa infectiva em apressório são desconhecidos (GADKAR et al., 2001). A penetração da hifa na raiz se dá por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática parcial da parede celular vegetal por pectinases, celulases e hemicelulases produzidas pelo fungo. O baixo nível de atividade enzimática e a produção localizada dessas enzimas resguardam a integridade do tecido hospedeiro e minimizam a ativação do sistema de defesa vegetal, possibilitando o desenvolvimento do fungo nos tecidos da planta. A penetração da hifa pode ocorrer entre ou através das células epidérmicas e o crescimento fúngico pode ser tanto inter quanto intracelular no tecido cortical.

No córtex interno ocorrem algumas modificações, as hifas intracelulares diferenciam-se em arbúsculos, a membrana plasmática da célula vegetal sofre uma invaginação e ocorre o desenvolvimento da membrana periarbuscular. Nesta interface entre a membrana plasmática vegetal e a parede celular do fungo, ocorre a transferência bi-direcional de nutrientes (REINHARDT, 2007).

Os estágios morfológicos para o desenvolvimento da micorriza arbuscular podem ser visualizados na Figura 1.

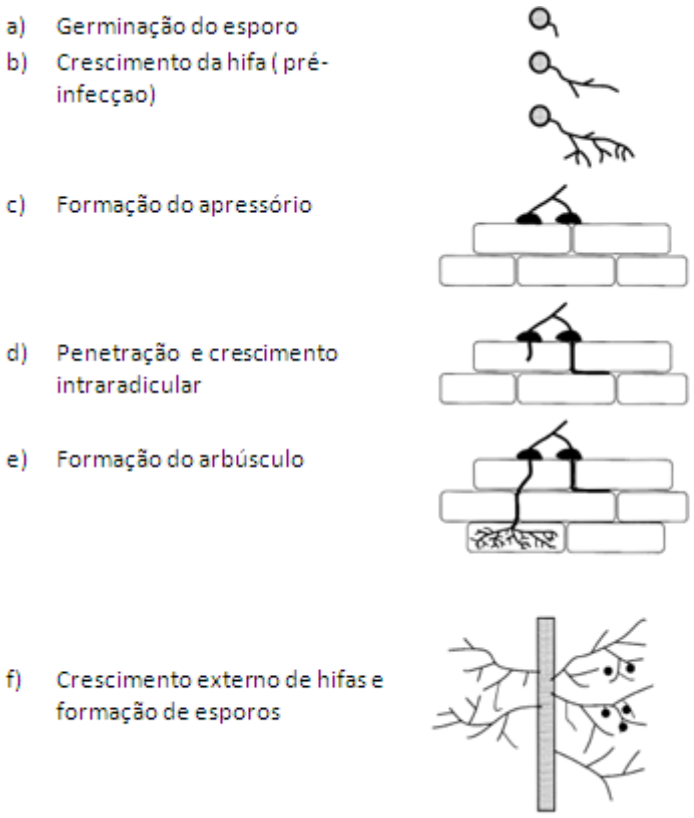

Figura 1 - Estágios do desenvolvimento de micorriza arbuscular em *M. truncatula*, esquema proposto por Marsh e Schultze et al. (2001)

Um dos principais fatores que regulam o desenvolvimento das MAs é a concentração de P nas plantas. Altas concentrações de P resultam em baixos níveis de colonização intrarradicular e baixa eficiência simbiótica. Muitas vezes, altas concentrações de P na planta podem resultar em depressão do crescimento da planta hospedeira (KIRIACHECK et al., 2009). No entanto, os mecanismos pelos quais o P regula o desenvolvimento de MAs não são conhecidos. Várias hipóteses tem sido levantadas para explicar a regulação das MAs por P, dentre eles o balanço de açúcares nas raízes, alteração da permeabilidade da membrana nas raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e alteração da expressão de genes de defesa vegetais (LAMBAIS; MEHDY, 1993).

Lambais e Mehdy (1995) propuseram um modelo para explicar o desenvolvimento da simbiose, haveria supressão da expressão de genes de defesa vegetal, enquanto que em condições de alto P, desfavoráveis ao desenvolvimento da simbiose, a supressão da expressão desses genes seria atenuada ou haveria indução nas proximidades das hifas. Os autores propuseram ainda que a regulação diferencial de genes de defesa seria mediada por alterações no balanço hormonal nas plantas micorrizadas.

Na natureza as plantas são colonizadas por uma grande diversidade de microrganismos. Alguns deles estabelecem relações patogênicas e induzem o desenvolvimento de doenças, enquanto outros desenvolvem relações mutualistas.

Para se defender contra os diferentes tipos de patógenos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa que reagem ao ataque de patógenos pela ativação local e sistematicamente de genes de defesa (TERRY et al., 2004; VAN LOON et al., 2006).

Nos momentos iniciais da interação das planta com microrganismos, ocorre o reconhecimento mútuo de sinais moleculares, resultando na alteração do fluxo de íons através da membrana e alteração do estado redox da célula vegetal. A transdução do sinal molecular resulta também na ativação ou supressão de vários genes do sistema de defesa vegetal (DELLEDONNE et al., 2001; BARI; JONES 2009).

Uma das resposta de defesa das plantas é a formação do ácido linolênico à parti de ácidos graxos não-saturados da membrana. O ácido linolênico é o precursor do ácido jasmônico.Um regulador do crescimento vegetal, associado com a indução de respostas de defesa sistêmicas. Além do ácido jasmônico, dois outros reguladores de crescimento vegetal estão envolvidos na transdução de sinais moleculares em interações planta-microrganismos: ácido salicílico e o etileno (CREELMAN; MULLET, 1997; HOWE, 2005; BARI; JONES, 2009). Em várias situações, esses hormônios vegetais atuam conjuntamente, de forma sinérgica ou antagônica, no processo de transdução dos sinais moleculares microbianos.

2.2 Envolvimento de hormônios vegetais no desenvolvimento de MAs

Hormônios vegetais são moléculas que agem que agem como reguladores do desenvolvimento das plantas (DAVIES, 1955). Dentre os hormônios, ácido jasmônico (AJ), ácido salicílico (AS), etileno (ET), e ácido abscísico (ABA) têm papéis regulatórios importantes em interações planta-microrganismo e poderiam estar envolvidos também na regulação de MAs (PARNISKE, 2004).

O ABA regula a síntese de proteínas e lipídeos de armazenamento na semente, a promoção da tolerância a dessecação e dormência da semente, e a inibição das fases de transições do crescimento embrionário ao germinativo. Além disso, ABA pode estar envolvido em algumas respostas fisiológicas a estresses ambientais. Em MAs, tem sido demonstrado que o ABA desempenha um papel importante no estabelecimento da simbiose funcional. A análise da colonização micorrízica no mutante de tomate *sitiens,* o qual apresenta um baixo nível de ABA, mostrou uma redução de 70% da colonização intrarradicular. Em comparação com plantas selvagens. Além disso, foi observado que muitos arbúsculos apresentavam um desenvolvimento incompleto nesse mutante, sugerindo que o ABA é necessário para a funcionalidade do arbúsculo e para uma colonização sustentada na raiz da planta (HERRERA-MEDINA et al., 2007).

O ácido salicílico é um hormônio que está envolvido no desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida, podendo ativar enzimas antioxidantes em plantas, em resposta a diferentes estresses (XU et al., 2008).

Costa et al. (2000) demonstraram que a aplicação exógena do ácido salicílico no solo inibe a colonização micorrizica intrarradicular em feijoeiro, de forma semelhante a condições de alto P no solo. Adicionalmente, o AS induziu a atividade de quitinases e inibe a atividade de β -1,3-glucanases nas raízes de feijoeiro. Da mesma forma em plantas de *Nicotina tabacum*, (tabaco) os teores de ácido salicílico estão inversamente correlacionados com o grau de colonização de colonização por FMAs (HERRERA-MEDINA et al., 2003). Porém a aplicação exógena de AS em folhas de *Cucumis sativus* não teve efeito sobre a colonização dos FMAs (LUDWIG-MULLER et al., 2002).

Blilou et al. (2000) observaram que aumentos das atividades de catalase e ascorbato peroxidase em tabaco, ocorre entre 3 e 5 dias após a inoculação com o fungo *G. mosseae*, com um aumento no nível endógeno do ácido salicílico em 5 dias. Após esse período, ocorre uma redução tanto nos níveis de ácido salicílico como na atividade dessas enzimas.

Esses resultados sugerem que os acúmulos diferenciais de ácido salicílico nas plantas podem estar associados com a regulação do crescimento intrarradicular dos FMAs.

O etileno é um hormônio vegetal gasoso, a sua biossíntese ocorre através da transformação do S-adenosilmetionina (AdoMet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carbooxilico (ACC). O passo limitante na produção de etileno é a conversão do AdoMet para ACC, essa etapa é catalisada pela ACC sintase (KENDE, 1993).

O etileno atua em baixas concentrações, participando da regulação de quase todos os processos de desenvolvimento das plantas. Alguns dos seus efeitos conhecidos são crescimento e diferenciação celular, formação de raízes adventícias, germinação de sementes, indução da floração em algumas espécies, abscisão e senescência de folhas, flores e frutos. O etileno também está envolvido nos processos de resposta a estresses de caráter biótico ou abiótico como ataques de patógenos e injúrias nos tecidos vegetais e pode estar associado a outros hormônios como auxina, AJ, ABA, AS (MCKEON; YANG 1987; KIEBER, 2004 ETHERIDGE et al., 2006).

Lynch e Brown (1997) sugerem que o etileno pode ajudar a planta a distinguir um simbionte benéfico de um patogênico. Porém, o papel do etileno na simbiose MA é altamente variável, mas seus efeitos são considerados como inibidor da formação de FMAs.

McArthur e Knowles (1992) utilizaram *Solanum tuberosum* inoculada com *Glomus fasciculatum* sob diferentes níveis de P, e observaram que as MAs causaram alterações na produção endógena de etileno na planta hospedeira. Da mesma forma, Besmer e Koide (1999) utilizando plantas de *Antirrhinum majus* inoculadas com *G. intraradices* relataram que ocorreu uma diminuição na produção de etileno nas flores.

A redução da colonização intrarradicular por *Glomus aggregatum* em raízes de *P. sativum* com aplicação continua de 5,5 µL de etileno/L e *Allium porrum* com aplicação

de 0,6 µL de etileno/L demonstraram que o excesso de etileno tem um efeito inibitório na colonização por FMAs (GEIL et al., 2001: GEIL;GUINEL, 2002).

Da mesma forma, em plantas mutantes de tomateiro superprodutor de etileno (*epinastic*) colonizados com *Glomus clarum*, ocorreu uma redução da colonização intrarradicular e altos níveis de transcritos de genes que codificam uma quitinase básica, em comparação ao controle Micro-Tom (Zsögön et al., 2008).

O ácido jasmônico e seus jasmonatos são reguladores hormonais envolvidos em vários processos fisiológicos, principalmente nas respostas a estresses bióticos, tais como resposta a herbivoria, patógenos, estresses salinos (MOONS et al., 1997) e vários processos durante o desenvolvimento da plantas (CREELMAN e MULLET, 1997; WASTERNACK e HAUSE 2006), tais como promoção de senescência (HE et al., 2002), desenvolvimento de órgãos sexuais (FEYS et al., 1994; LI et al., 2004), produção de tricomas (LI et al., 2004) e produção de metabólitos secundários (CHEN et al., 2006).

Os jasmonatos apresentam papéis fundamentais na transdução de sinais moleculares levando à ativação de genes de defesas e em alguns casos de forma sinérgica com o etileno (ROJO et al., 2003; LORENZO;SOLANO, 2005).

Especulações sobre um possível envolvimento do ácido jasmônico com o estabelecimento da simbiose MAs, foram elaboradas a partir de experimentos com aplicações exógenas de AJ.

Regvar et al (1996) demonstraram que em plantas de *Allium sativum* inoculadas com *Glomus intraradices* e com aplicações exógenas de ácido jasmônico em baixas concentrações (5 µM uma vez por semana) estimularam o desenvolvimento de MAs.

Porém, a aplicação exógena de ácido jasmônico em altas concentrações (0,05-5mM a cada dois dias) em folhas de *Tropus majus*, *Carica papaya* e *Cucumis sativus* inoculadas com *Glomus mosseae* demonstraram nível de colonização intrarradicular drasticamente reduzido (LUDWIG-MULLER et al., 2002).

Hause et al. (2002) relataram que em raízes de cevada colonizadas por *Glomus intraradices* ocorreu uma aumento de 5 vezes no nível endógeno de ácido jasmônico e um aumento de 2,5 vezes em seu aminoácido conjugado, o JA-isoleucina, em comparação a plantas não inoculadas, o que sugere influência dos FMAs.

2.3 Comunicação cruzada entre vias de sinalização através de diferentes hormônios

Em interações planta-microrganismos, é comum a ocorrência de comunicação cruzada entre diferentes vias de transdução de sinais, através de hormônios vegetais.

Vários trabalhos têm demonstrado que as plantas modulam a abundância de ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, modificando a expressão de genes relacionados com a defesa e coordenando interações complexas entre as vias de sinalização para ativar uma resposta de defesa efetiva contra ataques de vários patógenos, pragas e estresse abióticos (DING et al., 2002; LORENZO; SOLANO 2005; BALBI; DEVOTO, 2008).

Apesar de muitos estudos, pouco se sabe sobre a comunicação cruzada de diferentes vias de transdução de sinais envolvendo hormônios vegetais durante o desenvolvimento de MAs.

Experimentos utilizando abordagens genéticas mostraram que o hormônio vegetal ABA desempenha um papel fundamental no estabelecimento e desenvolvimento da simbiose funcional. Herrera-Medina et al. (2007) demonstraram que em raízes do tomateiro mutante no hormônio ABA (*sitiens*) ocorria uma redução na taxa de colonização intrarradicular por *Glomus clarum*. As plantas *sitiens* são menos suscetíveis à infecção por FMAs e o nível de colonização pode ser reduzido em até 70%, comparado as plantas selvagens, além disso a maioria dos arbúsculos presentes apresentam um desenvolvimento incompleto. O que sugere que o hormônio ABA é essencial para estabelecimento da simbiose. Além do mais, foi demonstrado que em mutantes deficientes de ABA, ocorrem níveis elevados do hormônio etileno.

Zsögön et al. (2008) demonstraram que em plantas mutantes de tomateiro superprodutor de etileno (*epinastic*) e no mutante insensível ao etileno (*never ripe*), ocorre uma redução da colonização intrarradicular por *Glomus clarum*, . Os resultados sugerem que altas concentrações de etileno podem inibir a colonização, porém em baixas concentrações pode estimular o estabelecimento da simbiose.

Garcia-Garrido et al.(2010) através de experimentos com microarranjos de DNA, observaram que plantas mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Rheinlands Ruhm) deficientes em ABA e inoculadas com *Glomus intraradices,* ocorreu uma alta regulação de genes envolvidos na defesa celular, na modificação da parede, e genes da via do etileno, enquanto que em planta selvagem ocorreu a ativação de genes relacionados à caroteno e síntese de giberelina. A via de biossíntese das oxilipinas foi ativada apresentando a expressão de dois genes em raízes, principalmente nos estágios finais da colonização, sugerindo que o etileno e o ácido jasmônico são reguladores fundamentais do desenvolvimento de MAs.

López-Ráez et al. (2010) em raízes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv MoneyMaker) colonizadas por *G. mosseae* e *G. intraradices,* e com o uso microarranjos de DNA avaliaram o acúmulo de transcrito dos hormônios AJ, ET, AS e ABA . Os resultados demonstraram uma indução dos genes que codificam enzimas relacionadas com o metabolismo e regulação das oxilipinas e da sintese do ET.

Lorenzo et al.(2003) sugeriu que a seleção da resposta adequada para cada estimulo parece ser determinada pelo tipo de interação estabelecida entre as vias de sinalização do AJ e ET .

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais biológicos

O inóculo do fungo micorrízico *Glomus clarum*, foi obtido de vasos de multiplicação, sendo composto por uma mistura de solo, raízes colonizadas de *Brachiaria decumbens,* esporos fúngicos e hifas, obtido junto ao Laboratório de Microbiologia do Solo, Departamento de Ciência do Solo, – ESALQ/USP.

Mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) superprodutor de etileno (*epi*), insensível ao ácido jasmônico (*jai1-1*) e duplo mutante *epijai1-1* utilizados neste trabalho foram introgredidos na cultivar Micro-Tom (MT) (CARVALHO, 2008, CAMPOS 2009).

3.2 Instalação do experimento e condições de crescimento

Sementes dos genótipos de tomateiro *epi, jai1-1*, *epijai1-1* e MT foram semeadas em bandejas de isopor® 40x20 cm contendo areia e vermiculita (2:1, v/v) lavada e autoclavada por 3h à 120ºC.

Após o período de germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos contendo 500 g de substrato esterilizado, e aproximadamente 10 g do inóculo micorrízico. As plantas dos tratamentos não inoculados receberam somente o substrato esterilizado.

Todas as plantas foram adubadas com: 240 mg N kg^{-1} (na forma de NH_4NO_3 dividido em três aplicações a cada dez dias), 270 mg K kg^{-1} (na forma de KCl), 120 mg Ca kg^{-1} (na forma de $CaCl_2.2H_2O$), 60 mg kg^{-1} (na forma de $MgSO_4.7H_2O$), 1 mL de solução de Fe-EDTA de Hoagland e 1mL 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 KH_2PO_4).

Os tratamentos foram arranjados em blocos casualizados, com 10 repetições. A colheita do experimento foi realizada 37 dias após o transplantio.

Na colheita, as raízes foram lavadas em água corrente e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente. Cada genótipo teve o terço médio do sistema radicular coletado e armazenado em etanol 70%, para a avaliação da colonização micorrízica intrarradicular. As raízes remanescentes foram congeladas com nitrogênio liquido e mantidas a -80ºC para as análises posteriores.

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação no Departamento de Ciência do Solo, ESALQ, USP.

Figura 2 – Experimento realizado em condições de casa-de-vegetação.

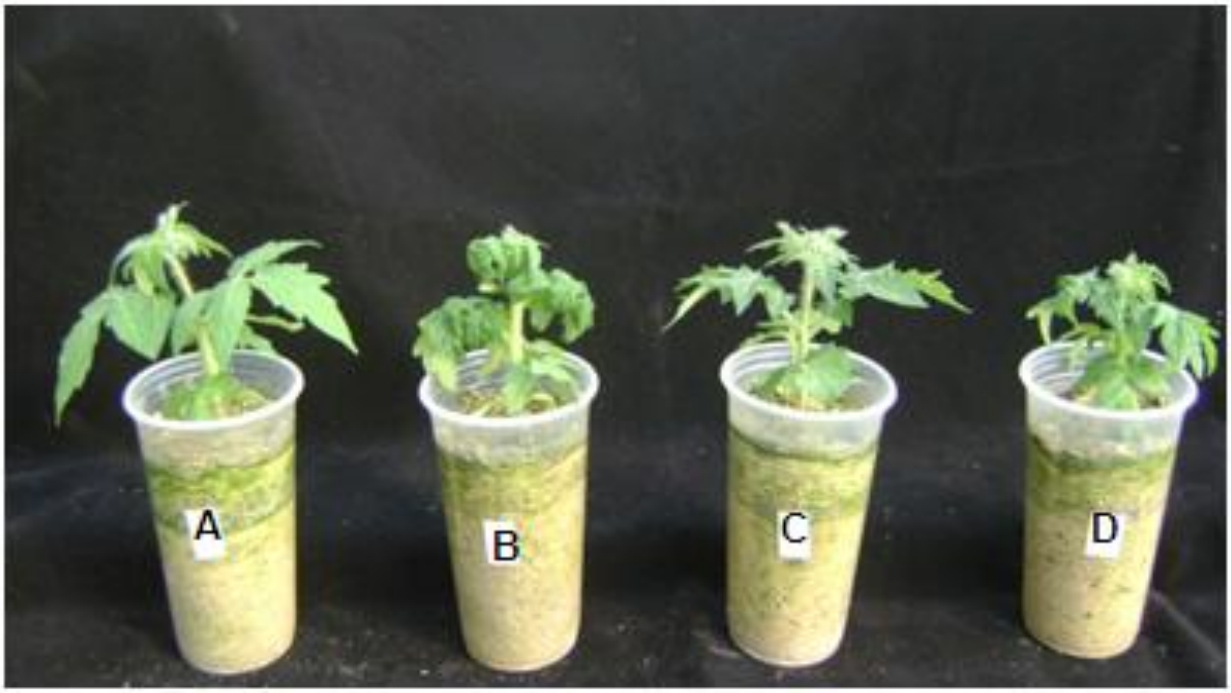

Figura 3 - Fenótipo das plantas mutantes utilizadas nos experimentos. A- cv Micro-Tom, B- *epinastic,* C- *epijai1-1*, D- *jai1-1*

3.3 Tratamento do genótipo *jai1-1* com metil jasmonato exógeno

O fenótipo do mutante *jai1-1* pouco difere de MT durante o estágio vegetativo, e suas características morfológicas mais marcantes como a leve protusão do estilete e total ausência de tricomas nos frutos jovens são observadas durante o estágio reprodutivo da planta entre 50 e 70 dias (LI et al., 2004).

Li et al. (2004) propuseram um mecanismo de triagem em estágio juvenil, pois plântulas de tomateiro crescendo em meio contendo metil - jasmonato (MeJA) apresentam um acúmulo de antocianina no hipocótilo e inibição de crescimento radicular, porém, as plantas insensíveis a esse hormônio, são capazes de crescer e se desenvolver normalmente.

Como no presente trabalho, as plantas foram coletadas com 37 dias, a triagem em estágio juvenil foi realizada como proposto por Li et al. (2004).

Sementes de *jai1-1* foram germinadas em caixas plásticas pretas (gerbox) contendo papel de filtro umedecido com água destilada, na ausência de luz e a temperatura de 25ºC. Após cinco dias, as sementes germinadas apresentavam radículas. Essas foram transferidas para uma outra caixa gerbox contendo um papel de filtro embebido com 10 mL de MeJA 0,5mM (Sigma-Aldrich) dissolvido em 75 µL de etanol. O gerbox foi mantido no escuro a 25ºC por mais dois dias. Após esse período, o gerbox foi transferido para ambiente com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 25ºC, por mais dois dias. Ao final deste período, as plântulas que apresentavam resposta ao MeJA, foram separadas daquelas que cresciam normalmente devido a insensibilidade ao jasmonato.

O tratamento exógeno com MeJA em sementes *jai1-1* foi realizado no laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, USP.

As plântulas selecionadas foram aclimatadas em casa-de-vegetação no mesmo substrato utilizado para os demais genótipos (descrito no item 3.2).

3.4 Determinação do efeito do tratamento das sementes com MeJA na micorrização

Com a finalidade de determinar se houve algum efeito inibitório do MeJA usado para a triagem dos mutante *jai1-1,* na colonização intrarradicular por *G. clarum*, um novo experimento foi realizado, conforme descrito acima com, algumas modificações.

Neste experimento foram utilizadas sementes dos genótipos *jai1-1* e Micro-Tom, como controle. As sementes de *jai1-1* não foram tratadas com MeJA, como descrito no experimento anterior

As plantas *jai1-1* passaram por triagem fenotípica e triagem genotípica como descrito anteriormente (descrito no item 3.5, 3.6).

O inóculo fúngico, a instalação do experimento e as condições de crescimento, foram as mesmas utilizadas no experimento anterior (descrito no item 3.1, 3.2). As

plantas foram colhidas com 23, 30 e 37 dias após o transplantio, para avaliação da colonização intrarradicular, conforme descrito no (descrito no item 3.8).

3.5 Triagem fenotípica dos mutantes *epijai1*

As plantas mutantes *epijai1* foram selecionadas em meio a uma população segregante. Neste caso a geração de plantas F2 apresenta uma segregação 9:3:3:1, em que 1:15 corresponde à frequência de plantas *epi/epi jai1/jai1.* A seleção foi feita buscando o fenótipo das duas mutações na mesma planta.

3.6 Triagem genotípica dos mutantes *epijai1*

Após a seleção fenotípica das plantas, com o intuito de se confirmar a integridade das mutações em homozigoze, foi realizada a triagem genotípica. Para isso, folhas jovens das supostas plantas duplo mutante foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio liquido e armazenados a - 80°C, até o momento de utilização das mesmas para a extração de DNA.

A extração do DNA genômico das amostras foi realizada a partir de cerca de 150 mg de tecido vegetal macerado com nitrogênio líquido, usando-se CTAB, de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1996), com algumas modificações. Após a transferência de aproximadamente 150 mg do macerado para tubos de polipropileno de 1,5 mL, identificados para cada amostra, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (10% CTAB; 100 mM Tris pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 0,7 mM NaCl;1% polivinil pyrrolidone; 2% β-mercaptoetanol). Para completa homogeneização, os tubos foram agitados em vortex, e em seguida aquecidos a 65°C por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos. Após o resfriamento dos tubos, 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v:v) foram adicionados ao extrato e homogeneizado invertendo-os por 2 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 *g.* O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 400 µL de isopropanol gelado e homogeneizado suavemente até formar um precipitado. A suspensão foi novamente centrifugada durante 15 minutos a 12.000 *g*, O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, e em seguida

com etanol 95%, com centrifugação a 12.000 *g* por 5 minutos, para a remoção de sais. O DNA precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar e em seguida foi solubilizado em 50 µL de água contendo RNAse (10 µg/µL), para eliminação de RNA contaminante após incubação por 30 minutos a 37°C. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Para a verificação da integridade do DNAs extraído, uma alíquota de 5 µL de cada amostra de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, A visualização do DNA foi feita por densitometria usando-se um densitometro a laser após coloração do DNA com SYBR Green.

Amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria à 260 nm. A pureza do DNA foi determinada pela relação das absorbâncias à 260 e 280 nm (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

3.7 Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

DNAs das amostras utilizado para amplificação por PCR conforme proposto por Li et al. (2004) com modificações.

Para uma reação de amplificação, foi utilizado 50ng de DNA genômico, e uma solução contendo 5 µL de tampão para PCR (10X), 2 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 1 µL de dNTPs (10mM), 1µL de cada iniciador (10 µM cada) (5'GTG GTC AGA TCA GAG CCC TCT ATT 3'), (5'GTG GAG ACG ATA TGT TGA GAC TAA3') e (5'CCA TGG AGT CCA TCA CCT AAC ACT3') 0,4 µL de DNA polimerase Taq (5U/µL) e água milliQ até completar o volume final de 50 µL. A amplificação do DNA foi feita em um termociclador PTC-100 MJ-Research. As condições da PCR foram as seguintes: 94ºC por 2 minutos, 35 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 54ºC (54ºC a 58 ºC) por 1minuto, 72ºC por 2 minutos, e extensão final a 72ºC por 10 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.8 Avaliação da colonização micorrízica intrarradicular

Para a avaliação da colonização micorrízica intrarradicular é necessário remover o conteúdo citoplasmático das raízes e fazer a coloração das estruturas fúngicas. Para isso as raízes foram tratadas com uma solução de KOH 10% a 90ºC por 30 minutos,

em seguida as raízes foram transferidas para um béquer contendo uma solução de tinta de caneta Parker 5% (v/v) diluída em solução de ácido acético, a 90ºC durante 2 minutos. Após a coloração, as raízes foram lavadas em ácido acético 5% e armazenadas em lactoglicerol (VIERHEILIG et al., 1998).

A taxa de colonização das raízes foi determinada com base na presença de estruturas fúngicas no tecido cortical, utilizando-se um microscópio estereoscópico (aumento de 72 vezes) pelo método da placa reticulada, de acordo com Giovanetti e Mosse (1980). Por microscopia de contraste de fase, foram analisadas as estruturas fúngicas no interior das raízes.

3.9 Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de etileno e ácido jasmônico

A análise da expressão dos genes ACS2 e ACO4 envolvidos na via de biossíntese do etileno, e OPR3 e AOC envolvidos na via de biossíntese do ácido jasmônico, foi feita por quantificação de transcritos por *PCR-quantitativa.*

3.9.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As raízes congeladas dos genótipos selecionados foram maceradas em nitrogênio líquido. O material macerado foi transferido para microtubos eppendorf com capacidade de 1,5 mL. A extração do RNA foi realizada com o regente TRizol® (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante.

A quantificação de RNA foi feita por espectrofotômetria a 260 nm. A integridade do RNA foi determinada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2%, utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg ml^{-1}) para a visualização do mesmo (SAMBROOK et al., 1989).

Para a eliminação do DNA contaminante, as amostras de RNA total (3 µg) foram tratadas, com 1 µL DNAse I livre de RNAse (Invitrogen), 1 µL do tampão da enzima, completando para um volume final de 10 µL com água tratada com DEPC

(dietilpirocarbonato). A reação foi realizada a 37°C por 30 minutos, sendo em seguida adicionado 1 µL de EDTA (25mM) em cada amostra e as mesmas aquecidas a 65°C por 10 minutos, para inativar a enzima.

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita em um volume total de 20 µL, (seguindo o protocolo da Invitrogen). Para isso foi utilizado 3 µg do RNA total tratado com DNAse, em cada amostra foi adicionado 50 ng de iniciadores Oligo-$dT_{(12-18)}$, 1 µL do DNTP Mix (10mM) completar o volume final com água tratada com DEPC. Para a desnaturação do RNA incubou-se a 65°C por 5 minutos e resfriou-se em gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 4 µL de 5X Fir-Strand Buffer, 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNAse Out e 1 µL da enzima SuperScript III (200 U/µL) (Invitrogen). As amostras foram incubadas a 50°C por 60 minutos, e posteriormente a 70°C por 15 minutos para inativar a enzima. Os cDNAS foram armazenados a -20ºC.

3.9.2 PCR-quantitativa (*qPCR*)

As amplificações quantitativas em tempo real das amostras de cDNA, foram realizadas utilizando-se um termociclador RotorGene 3000 (Cobertt Research, Austrália).

Para a *qPCR*, foi utilizado 1µL da diluição de cDNA 1:10 (v/v), 0,8 µM de cada iniciador especifico (Tabela 3) e 5 µL de Platinum SYBR-Green qPCR SuperMix-UDG 2X (Invitrogen), para um volume final de 10 µL. Todas as amostras foram amplificadas em triplicadas sob as seguintes condições: 95ºC por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95ºC por 10 segundos, 60ºC por 15 segundos e 72ºC por 20 segundos. No final da reação uma curva de desnaturação de 72ºC a 99ºC foi realizada. Em todos os experimentos foi utilizado 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). Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os valores da eficiência da reação de PCR (E) e do cycle thereshold (Ct) foram obtidos através do programa Rotor Gene Real Time Analysis (Corbett).

O cálculo das eficiências de amplificação e do acúmulo relativo dos transcritos foi feito através do programa *Relative Expression Software Tool* – 384 (REST-384© - version 1) (Pfaffl, 2001), (htpp://rest.gene-quantification.info/). Como controle constitutivo foi utilizado o gene rRNA-18S e plantas não inoculadas de cada genótipo.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas reações de *qPCR*

Gene	Acesso*	Iniciadores	Referências
OPR3	AJ278332	5' TCG CGT AGG CGT TAG AGT TT 3'	(1)
		5' GCC AAG GCT GAG TGG ATT AG3'	
AOC	AJ272026	5' TTC TAC TTC GGC GAT TAC GG 3'	(2)
		5' TGC TGC AAT TTC ACT TGA CC 3'	
LeACO4	AB013101	5' TGT CCC AAG CCA GAC TTG AT3'	(3)
		5' TGC CAT CTT GTT GAG CAA TC 3'	
LeACS2	AY337613	5' CGA GGA TTC GGA GGT TCG TAG GTG T 3'	(4)
		5' GGT GAG GGA GGA ATA GGT GAC GAA A 3'	
18S	AY552528	5' AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG 3'	(5)
		5' CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA 3'	

*= Número de acesso da sequência depositada no GenBank – NCBI

(1) STRASSNER et al. (2002); (2) ZIEGLER et al. (200); (3) ANSTEAD et al. (2009); (4) ZHANG et al., (2009); (5)TYBURSKI et al. (2008).

3.9 Análises Estatísticas

Os dados de colonização intrarradicular foram analisados através do programa Sisvar versão 5.5. Para a normalização, os dados foram transformados para arc sen $(x + 1)^{0,5}$ As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Triagem fenotípica

A triagem fenotípica das supostas plantas duplo mutantes foi realizada com 250 plantas. A seleção foi feita buscando-se o fenótipo *epi* e *jai1-1* em uma única planta. As plantas duplo mutante apresentam características aditivas de seus parentais (mutantes *epi* e *jai1-1*) com uma coloração mais forte e um leve encurvamento de suas pétalas.

Figura 4 - Triagem das plantas duplo mutante. A- flor do cv Micro-Tom, B- flor do mutante *epijai1*, com características aditivas do mutante *epi* e *jai1-1*

Figura 5 - Características aditivas foram buscada na triagem das plantas *epijai1-1.*
A- *epijai1*, B- mutante *epinastic*, C- cv Micro-Tom.

4.2 Triagem genotípica

Após a seleção das plantas por triagem fenotípica, com o intuito de se confirmar a integridade das mutações em homozigoze, foi realizada a triagem genotípica das plantas por PCR.

Como a mutação *jai1-1* foi induzida por radiação gama, foram utilizados dois iniciadores reversos (um para amplificar o mutante *jai1-1* e o outro para amplificar o MT) e um iniciador foward.

A planta com genótipo MT produzirá um amplicon com 525 pb, enquanto o genótipo *jai1-1* produzirá um amplicon com 777 pb. Como as plantas são F2 e estão em homozigose, o resultado da amplificação deverá ser um amplicon de 777bp.

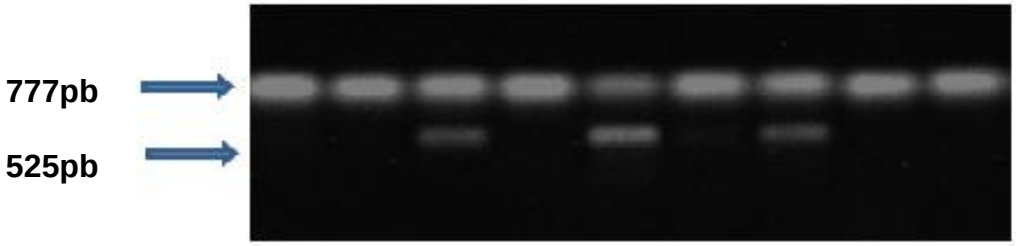

Figura 6 - Gel de agarose com produtos de amplificação das plantas duplo mutante *epijai1-1* . MT apresenta um fragmento de 525 pb, enquanto que o duplo mutante em homozigose corresponde a um fragmento de 777pb.

4.3 Colonização micorrízica intrarradicular

Os dados de colonização intrarradicular foram analisados através do programa Sisvar versão 5.5 e são apresentados na tabela 2. Para a normalização, os dados foram transformados para arc sen $(x + 1)^{0,5}$. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 2 - Colonização intrarradicular de genótipos de tomateiros inoculados com *Glomus clarum*

Genótipo do tomateiro	% Colonização
Micro-Tom	46,07± 3,46 a
Epi	30,12±1,50 b
epijai1	24,41±1,21 b
jai1-1	0.00 c

Os dados representam médias de 5 repetições . Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$).

As plantas do genótipo Micro-Tom apresentaram uma taxa de colonização intrarradicular por *Glomus clarum*, estatisticamente maior do que os demais genótipos avaliados.

A colonização no mutante superprodutor de etileno *epi,* apresentou uma redução no nível de colonização, se comparado ao genótipo Micro-Tom (Tabela 2).

Este resultado é similar ao obtido por Zsögon et al. (2008) em que o mutante *epinastic* mostrou uma menor taxa de colonização intrarradicular por *G. clarum* do que o genótipo não mutante em baixa concentração de P.

A colonização do genótipo *epijai1* superprodutor de etileno e insensível ao ácido jasmônico, não diferiu estatisticamente daquela observada para o genótipo *epi.*

Tanto no mutante *epi* como o duplo mutante *epijai1 e o cv* Micro-Tom foram observadas estruturas intrarradiculares, como hifas, arbúsculos e vesículas. Porém no duplo mutante foi observado uma alta concentração de vesículas (Figuras 7 e 8).

No mutante insensível ao ácido jasmônico *jai1-1* não foi observada a colonização intrarradicular. Em algumas partes do sistema radicular foi possível observar uma grande quantidade de hifas externas em contato com a raiz, mas sem penetração (Figura 8).

Para determinar se o tratamento prévio das sementes com MeJA durante a triagem dos mutantes estava inibindo a colonização intrarradicular, um segundo experimento foi realizado com o mutante *jai1-1*.

O resultado para o mutante insensível ao ácido jasmônico *jai1-1* foi idêntico ao anterior, não apresentando nenhuma colonização intrarradicular ao longo do tempo (Tabela 3), o que comprova que a triagem prévia com MeJA, não interferiu no processo de colonização. No genótipo Micro-Tom ocorreu um aumento gradual na colonização intrarradicular com o tempo de cultivo, como esperado.

Com base nesses resultados é possível sugerir que a insensibilidade ao ácido jasmônico no mutante *jai1-1*, resulta em um bloqueio da colonização intrarradicular pelos FMAs. O cultivar Micro-Tom foi estatisticamente diferente para todos os tempos coletados ($p<0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Colonização intrarradicular de genótipos de tomateiros inoculados com *Glomus clarum*

Genótipo do tomateiro	**% Colonização**
MT 23 Dias	6,21± 1,9 a
MT 30 Dias	23,49±1,8 b
MT 37 Dias	46,89±2,2 c
jai1-1 23 Dias	0.00 d
jai1-1 30 Dias	0.00 d
jai1-1 37 Dias	0.00 d

Os dados representam médias de 5 repetições . Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Tukey ($p<0.05$).

O etileno é considerado um inibidor da formação de MAs e este efeito tem sido demonstrado em várias combinações fungos-plantas.

O experimento com o mutante *epinastic* de tomateiro demonstrou que o etileno em excesso na planta, promove uma redução na taxa de colonização intrarradicular, em condições de baixo P no substrato de cultivo.

Azcón-Aguilar et al. (1981) relataram que a colonização intrarradicular por *Glomus mosseae* diminuía em *Triticum vulgare e Medicago truncatula* quando aplicado etileno no substrato. Similarmente, Ishii et al.(1996) demonstraram que a aplicação exógena de etileno em *Poncirus trifolata* inibia a colonização por *Gigaspora. ramisporohora.*

A colonização intrarradicular de *Pisum sativum* e *Allium porrum* por *G. aggegatum* também diminuíram em função do excesso de etileno (GEIL et al., 2001; GEIL; GUINEL, 2002). Em contraste em plantas de *Linum usitatissimum* a adição de etileno resultou no aumentou da colonização intrarradicular nas raízes (DUGASSA et al., 1996), enquanto que em *Lycopersicon esculentum* inoculados com *G. mosseae*, não foi identificado nenhuma alteração (VIERHEILIG et al., 1994).

McArthur e Knowles (1992) observaram que em *Solanum tuberosum* inoculada com *Glomus fasciculatum* e com diferentes níveis de P ocorriam alterações na produção de etileno, as raízes colonizadas apresentavam atividade reduzida de ACC oxidase em relação às raízes não-colonizadas, sugerindo que os FMAs são capazes de suprimir a expressão de genes envolvidos na via biossintética do etileno.

É possível também que o ácido jasmônico tenha papel importante no controle da colonização intrarradicular em MAs.

No entanto, os dados experimentais são altamente controversos (GUTJAHR; PASZKOWSKI, 2009; HAUSE; SCHAARSCHIMIDT, 2009).

No mutante *jai1-1,* o qual é totalmente insensível ao ácido jasmônico, não foi encontrado colonização intrarradicular. sugerindo que o excesso de ácido jasmônico, inibe a colonização intrarradicular, porém esse resultado difere de outros resultados presentes na literatura.

Regvar (1996) observou que a aplicação exógena de AJ promovia a colonização intrarradicular e aumentava o desenvolvimento de arbúsculos e vesículas em raízes de

Allium sativum colonizadas por *Glomus intraradices*. Em contraste, Ludwig-Muller et al. (2002) demonstraram que a aplicação exógena de ácido jasmônico em mamão e pepino, diminuía as taxas de colonização intrarradicular.

Outros relatos demonstraram aumentos nos níveis de AJ em raízes de *M. truncatula*, *H. vulgare*, *G. max* e outras plantas quando colonizadas por FMAs em relação às raízes não-micorrizadas (STUMPE et al., 2005; HAUSE et al., 2002; VIERHEILIG; PICHE, 2002; MEIXNER et al., 2005).

Em raízes de cevada colonizadas por *Glomus intraradides* também, foi observado um aumento no nível endógeno de AJ e seu aminoácido conjugado, o JA-isoleucina (HAUSE et al., 2002). Porém em *Nicotiana attenuata* os níveis de JA permaneceram inalterados em comparação ao seu controle não-inoculado (RIEDEL et al., 2008).

Usando uma abordagem genética reversa, foi demonstrado que a supressão parcial do gene que codifica a óxido aleno sintase (AOS), envolvida na síntese do ácido jasmônico em raízes de *M. truncatula* afeta negativamente a taxa de micorrização e a formação de arbúsculos (ISAYENKOV et al., 2005), indicando um papel essencial do AJ na colonização de raízes por fungos.

Herrera-Medina et al.(2008) utilizaram mutantes de tomateiro cv Moneymaker *jai-1* insensível ao AJ e verificaram que a colonização intrarradicular por *G. intraradices,* 45 dias após a inoculação do fungo, era maior do que no controle sensível (35% contra 9%). Esses dados contrastam com os resultados deste trabalho, onde mutantes de tomateiro jai-1 não apresentaram colonização micorrízica.

Estes autores demonstraram que ocorreu a formação de MAs em plantas mutantes *jai-1*. Seus resultados demonstraram que o mutante *jai-1* não regulou a colonização intrarradicular e foi mais susceptível a colonização do que o seu controle. A metodologia de triagem empregada neste trabalho foi somente por seleção fenotípica como descrito por Li et al. (2004). Como controles foram utilizadas plantas heterozigotas *Jai-1/-* (sensíveis ao AJ), sendo coletadas 45 e 60 dias após a inoculação com *Glomus intraradices*. Além da triagem fenotípica no presente trabalho foi feita a confirmação das plantas mutantes *jai1-1* por triagem genotípica, com o tamanho do amplicom confirmado. Como controle foi utilizado o cv Micro-Tom e mutantes *jai1-1* sem

inoculo, as plantas foram coletadas antes do estágio reprodutivo, 37 dias após a inoculação com *G. clarum*. A confirmação das plantas por triagem genotípica é fundamental pois as plantas de tomateiro apresenta, muitas similaridades fenotípicas, o que pode levar a interpretação de dados equivocados.

No caso do mutante *epijai1*, este apresentou colonização intrarradicular, mas em níveis inferiores àquelas observadas no mutante *epi.*

É possível que o excesso de etileno possa reverte a inibição observada no mutante insensível ao ácido jasmônico.

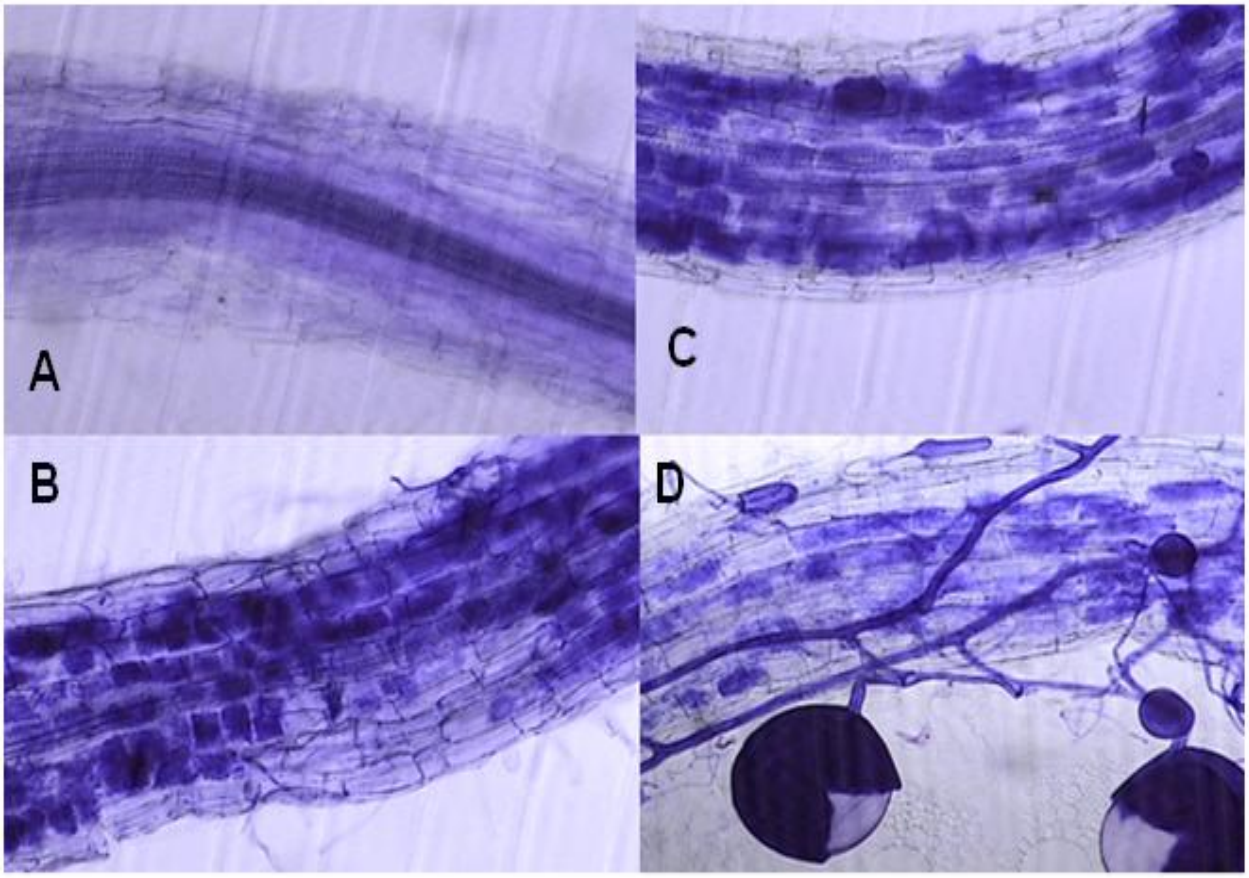

Figura 7 - Colonização intrarradicular de diferentes genótipos de tomateiro Micro-Tom por *Glomus clarum*. A- raiz de MT sem inoculo, B- raiz colonizada de MT, C e D- raízes do mutante *epi* colonizadas, presença de arbúsculos, hifas, vesículas e esporos.

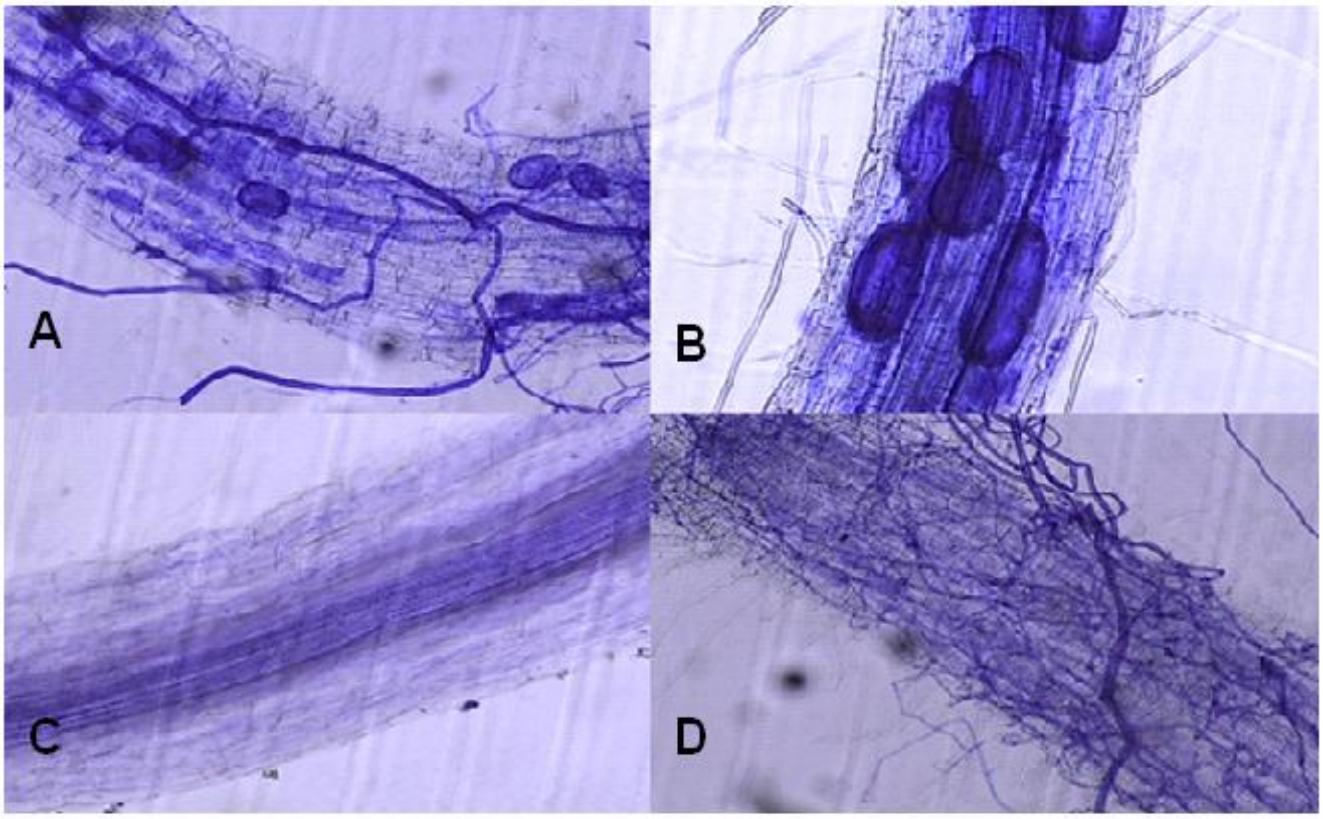

Figura 8 - Colonização intrarradicular de diferentes genótipos de tomateiro Micro-Tom por *Glomus clarum*. A e B- raiz do mutante *epijai1* colonizada, mostrando a presença de arbúsculos, hifas e uma grande quantidade de vesículas. C e D- raízes do mutante *jai1-1* mostrando a ausência de colonização intrarradicular e intenso crescimento de hifas extrarradiculares.

4.4 Análise da expressão de genes envolvidos na síntese de etileno e ácido jasmônico

Vários trabalhos têm demonstrado que as interações entre as vias de sinalização do etileno cooperam com a do ácido jasmônico na ativação de defesas contra patógenos necrotróficos e que antagoniza o ácido salicílico nas respostas a injúrias (BERROCAL-LOBO et al., 2002; DIAZ et al., 2002; ROJO et al., 2003; LORENZO; SOLANO, 2005; 2007).

Neste estudo foi utilizada PCR-quantitativa para avaliar a expressão de genes envolvidos na síntese de ácido jasmônico e etileno em mutantes hormonais inoculados com *Glomus clarum.*

Todos os oligonucleotídeos utilizados demonstraram especificidade e qualidade com apenas um pico através da curva de desnaturação (Figura 9).

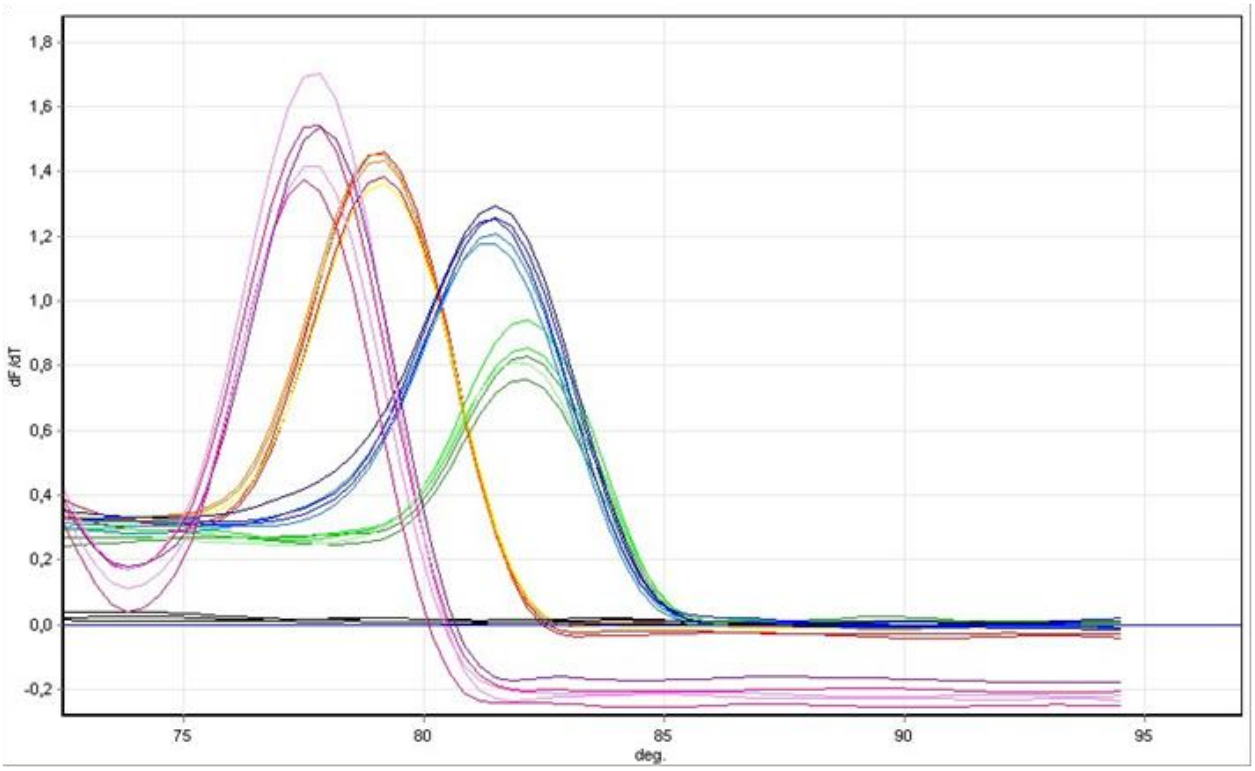

Figura 9- Curva de desnaturação para o cv Micro-Tom. Genes da via de biossíntese do AJ, Laranja- OPR3, Verde- AOC; Genes da via de biossíntese do etileno, Rosa- ACS2, Azul-ACO4.

4.4.1 Efeitos da colonização por FMAs

4.4.1.1 Genes da via de biossíntese do ácido jasmônico (OPR3 e AOC)

O acúmulo de transcritos para o gene OPR3 no cv Micro-Tom quando inoculado com *Glomus clarum* foi relativamente maior do que o seu controle não-inoculado. Porém, o gene AOC teve uma baixa expressão comparada ao controle não-inoculado, não sendo diferentes estatisticamente ($p<0,05$) (Figuras10 e 11).

O mutante *epinastic* quando inoculado com *Glomus clarum* também apresentou uma indução no acúmulo de transcritos tanto para OPR3 quanto para AOC em relação ao seu controle não-inoculado. Entretanto, essa indução foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) somente para o gene OPR3.

No mutante *jai1-1,* o qual apresenta insensibilidade ao ácido jasmônico, não ocorreu indução no acúmulo de transcritos para ambos os genes da via de biossíntese do ácido jasmônico. O acúmulo de transcritos de OPR3 e AOC foi semelhante tanto para as raízes micorrizadas quanto para seu controle não-inoculado.

O duplo mutante *epijai1* apresentou uma resposta diferente comparado aos outros mutantes, pois a sua insensibilidade ao ácido jasmônico não impediu que ocorre-se um acúmulo de transcritos para os genes da via do ácido jasmônico. Diferente do que foi observado no mutante *epinastic,* o duplo mutante *epijai1* inoculado com *Glomus clarum* tem sua expressão reduzida comparado ao controle não-micorrizado tanto para OPR3 quanto para AOC.

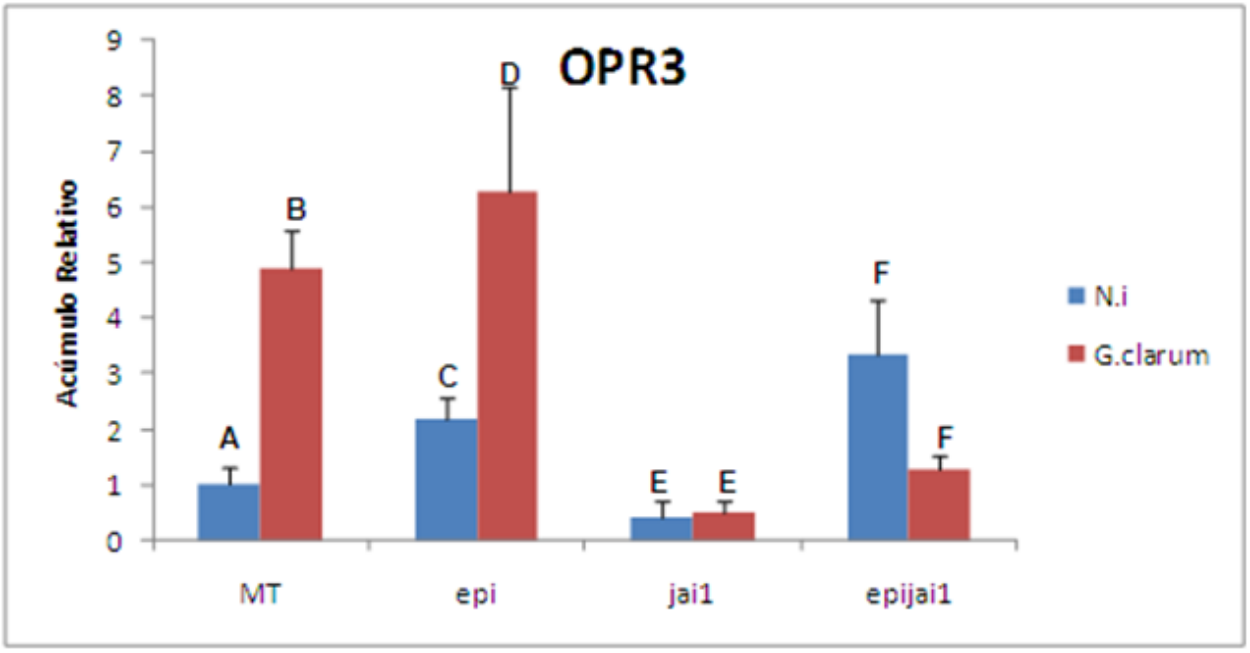

Figura 10 - Acúmulo relativo dos transcritos de OPR3 em mutantes de tomateiro. Os valores foram normalizados pela expressão do gene rRNA 18S. Ni, controle não inoculado. A, B, C, D, E e F, indicam o resultado do teste de comparação de médias (teste *t*) realizado somente entre cada genótipo e seu respectivo controle.

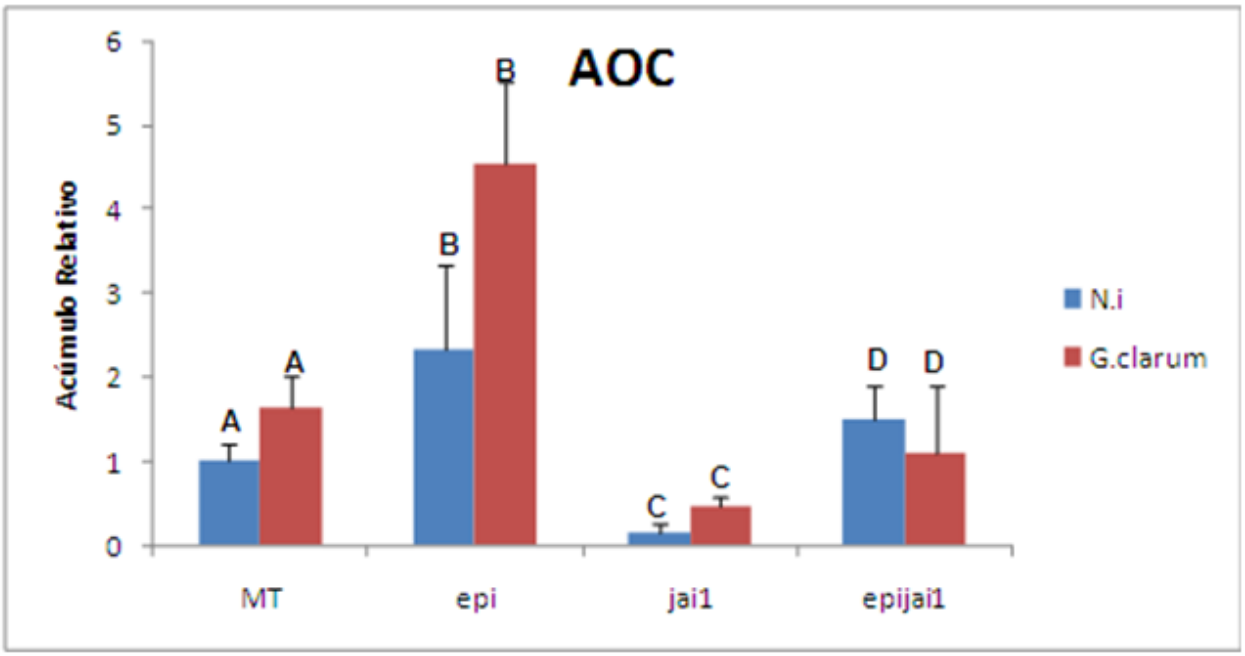

Figura 11 - Acúmulo relativo dos transcritos de AOC em mutantes de tomateiro. Os valores foram normalizados pela expressão do gene rRNA 18S. Ni, controle não inoculado. A, B, C e D, indicam o resultado do teste de comparação de médias (teste *t*) realizado somente entre cada genótipo e seu respectivo controle.

4.4.1.2 Genes da via de biossíntese do etileno

Os efeitos da colonização intrarradicular por FMAs para a via da biossíntese do etileno (ACO4 e ACS2) podem ser observados nas Figuras 12 e 13.

O cv Micro-tom quando inoculado com G. clarum apresentou uma indução no acúmulo de transcritos para ambos os genes da via de biossíntese do etileno em comparação ao seu controle.

O mutante *epinastic,* superprodutor de etileno, apresentou um alto acúmulo de transcritos para o gene ACO4 quando inoculado com *Glomus clarum,* sendo diferente estatisticamente do seu controle não-inoculado. Apesar de ocorrer um acúmulo de transcritos para o gene ACS2 não foi possível observar diferenças significativas entre o controle e a planta inoculada.

O duplo mutante *epijai1* não-inoculado apresentou um alto acúmulo de transcritos para o gene ACO4 quando comparado com os outro genótipos. Quando inoculado com *Glomus clarum* ocorreu uma redução significativa no acúmulo de transcritos ($p<0,05$). Para o gene ACS2, o acúmulo de transcritos foi relativamente menor do que o observado para ACO4, não ocorrendo diferenças significativas entre o duplo mutante inoculado e o seu controle.

O acúmulo de transcritos de ACO4 e ACS2 no mutante *jai1-1* foi similar àquele observado para os genes da via de biossíntese do ácido jasmônico. Não houve indução no acúmulo de transcritos tanto nas plantas micorrizadas quanto nas não-inoculadas.

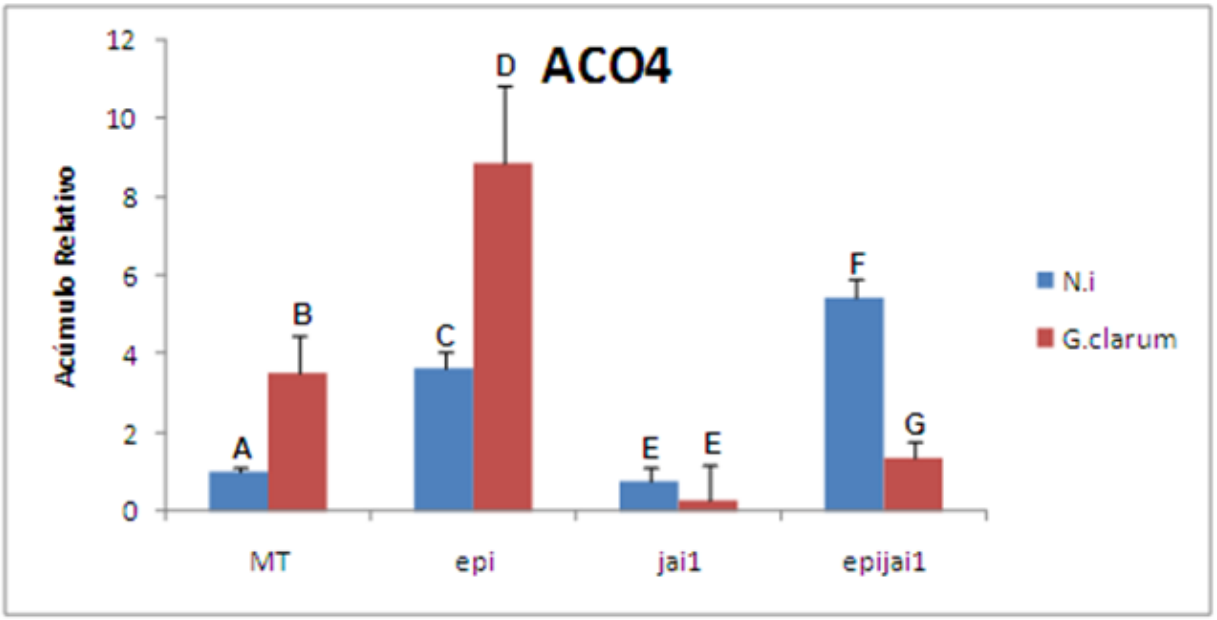

Figura 12 - Acúmulo relativo dos transcritos de ACO4 em mutantes de tomateiro. Os valores foram normalizados pela expressão do gene rRNA 18S. Ni, controle não inoculado. A, B, C, D, E, F e G, indicam o resultado do teste de comparação de médias (teste *t*) realizado somente entre cada genótipo e seu respectivo controle.

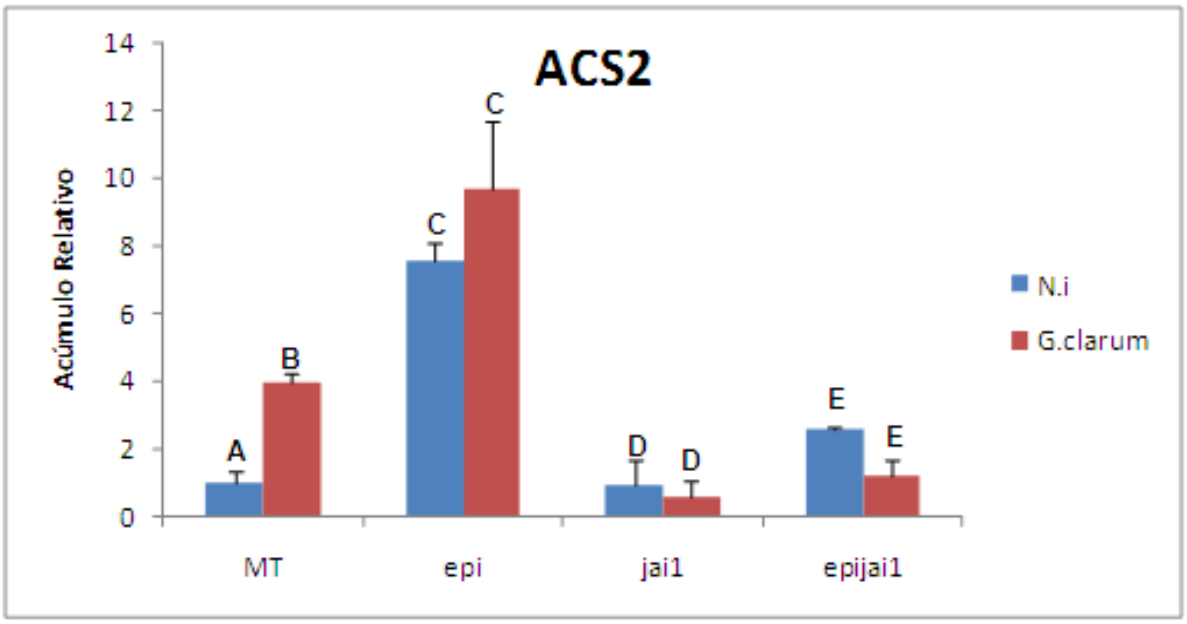

Figura 13 - Acúmulo relativo dos transcritos de ACS2 em mutantes de tomateiro. Os valores foram normalizados pela expressão do gene rRNA 18S. Ni, controle não inoculado. A, B, C, D e E, indicam o resultado do teste de comparação de médias (teste *t*) realizado somente entre cada genótipo e seu respectivo controle.

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que o bloqueio na via de sinalização do ácido jasmônico, não permite o estabelecimento do fungo micorrizico arbuscular, sugerindo que este hormônio pode exercer um importante papel nas vias de sinalização para o estabelecimento de MAs. Esses diferem daqueles obtidos por Herrea-Medina et al. (2008).

Está muito bem documentado que as associações mutualísticas envolvem um reconhecimento mútuo, com um alto grau de coordenação e regulação dos sinais moleculares entre os dois organismos (LAMBAIS, 2006; KIRIACHECK et al., 2009). Porém, poucos trabalhos são encontrados na literatura que avaliam o nível de acúmulo de transcritos para os genes da via de biossíntese de etileno e do ácido jasmônico em plantas com simbiose MAs. A maioria dos trabalhos são realizados com aplicações exógenas desses hormônios e o acúmulo de transcritos são observados através do gene LePT4, o qual codifica um transportador de fosfato especifico para simbiose com MAs, verificando a funcionalidade da simbiose.

Isayenkov et al. (2005) utilizando uma abordagem reversa, demonstraram que a supressão parcial do gene que codifica enzimas envolvidas na biossíntese do ácido jasmônico, como a AOC, a óxido aleno sintase (AOS) em raízes de *M. truncatula,* resultou em redução taxa de micorrização e formação de arbúsculos. Estes resultados conferem com o comportamento do duplo mutante *epijai1* que apresentou uma redução no acúmulo de transcritos da via biosintética do ácido jasmônico. Porém, o mutante *jai1-1* não apresentou colonização intrarradicular por FMAs e acúmulo de transcritos para os genes das vias de biossíntese tanto do ácido jasmônico como a do etileno foi menor do que no controle não-inoculado.

López-Ráez et al. (2010) avaliaram os níveis de transcritos em raízes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv MoneyMaker) colonizadas por *G. mosseae* e *G. intraradices,* utilizando microarranjos de DNA. Os resultados demonstraram uma indução dos genes que codificam enzimas relacionadas com o metabolismo e regulação das oxilipinas (LOXA, AOS1, AOS3, JAME, JAZ2), porém a indução dos genes OPR3 e AOC foram relativamente menos induzidos nas raízes micorrizadas.

Para confirmar esses resultados López-Ráez et al.(2010) investigaram se ocorre alterações nos níveis dos hormônios ABA, AS, ET, AJ e seus derivados em raízes de

tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv MoneyMaker) colonizadas por *G. mosseae* e *G. intraradices,* por espectrometria de massa. Os níveis de OPDA que é o precursor do ácido jasmônico foram significativamente maiores (<0,05) em todas as raízes colonizadas por ambos os FMAs.

Garcia-Garrido et al., (2010) avaliaram os níveis de transcritos em raízes de mutante de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Rheinlands Ruhm) deficientes em ABA (*sitiens),* colonizadas por *Glomus intraradices*, utilizando microarranjos de DNA. Os resultados demonstraram um conjunto de genes induzidos do metabolismo das oxilipinas, tanto em plantas selvagens como no mutante *sitiens* colonizada por *Glomus intraradices*.

Os resultados obtidos no presente trabalho avaliaram dois genes da via de biossíntese do ácido jasmônico, onde o mutante *epinastic* e o cv Micro-Tom demonstraram uma alta indução do acúmulo de transcritos para o gene OPR3 quando inoculado com *Glomus clarum.* Apesar de AOC não diferir estatisticamente do seu controle não-inoculado (p<0,05) o acúmulo de transcritos obtidos no mutante *epinastic* e no cv Micro-Tom foram maiores quando comparados aos dados de López-Ráez et al. (2010). Essa diferença nos resultados de acúmulo de transcritos entre os dois trabalhos pode estar relacionada com os diferentes organismos utilizados, porém, ambos os estudos demonstraram que o ácido jasmônico tem um papel fundamental no desenvolvimento da simbiose MAs, o que confere com o resultado obtido com o mutante *jai1-1*em que o acúmulo de seus transcritos foram relativamente reduzidos devido a presença da mutação na via de biossíntese do ácido jasmônico.

López-Ráez et al. (2010) também avaliaram se ocorre uma alteração no acúmulo de transcritos relacionados com a síntese de ET, ABA e AS, porém nenhuma diferença significativa foi observada para ABA e AS, exceto para os transcritos de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilico oxidades (ACO1) o qual está envolvido na via de biossíntese do etileno.

Este resultado confere com os obtidos na presente trabalho, pois o acúmulo de transcritos do gene ACO4 que também está envolvido na via de biossíntese do etileno, em raízes dos mutantes *epi, epijai1* e no cv Micro-Tom foram relativamente induzidos em comparação as raízes não-inoculadas (p<0,05),porém o mutante jai1-1 não

apresentou nenhuma indução de acúmulos para os genes da via do etileno,o que sugere que a sua mutação na via do ácido jasmônico, também interferiu na resposta de acúmulos de transcritos para os genes ACO4 e ACS2.

Na relação com simbiontes pouco se sabe sobre a interação das vias de sinalização dos hormônios vegetais. E como os organismos se comportam e respondem diferente para cada situação, seria necessário um estudo mais aprofundado com os simbiontes para avaliar a diversidade de resposta que esses organismos desenvolvem.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os hormônios etileno e o ácido jasmônico podem ter uma relação sinérgica durante o estabelecimento e desenvolvimento da Micorriza arbuscular.

5 Conclusões

O mutante *jai1-1* não apresentou colonização intrarradicular por *G. clarum* e o acúmulo de transcritos dos genes OPR3, AOC, ACO4, e ACS2 foi baixo, em relação ao controle Micro-Tom.

A triagem prévia com Meja não interferiu na colonização intrarradicular no mutante *jai1*.

O mutante *epinastic* apresentou colonização intrarradicular reduzida em comparação ao cv Micro-tom.

O mutante epinastic apresentou o maior acúmulo de transcritos para os genes da via de de biossíntese do etileno (ACO4 e ACS2) e do ácido jasmônico, o que sugere uma relação sinérgica entre esses hormônios.

O duplo mutante *epijai1* apresentou um comportamento intermediário entre o mutante *epinastic* e o mutante *jai1-1*. A insensibilidade ao ácido jasmônico não impediu a colonização intrarradicular por *G. clarum* e o acúmulo de transcritos para os genes da via de biossíntese do ácido jasmônico e do etileno.

REFERÊNCIAS

ANSTEAD, P.S.; 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** v.134, p. 170-181, 2009.

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

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Arbuscular mycorrhizal and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 6, p. 457-464, 1996.

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.

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**, v. 15, n. 6, p.791-797, 1998.

BARI, R; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol Biol**, Dordrecht, v.69, p. 473-478, 2009.

BECARD, G.; TAYLOR, L.P.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E.; DONER, L.W. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 8, p. 252-258, 1995.

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

BLILOU, I.; BUENO, P.A.; OCAMPO, J.; GARCÍA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae.* **Mycological Research,** Cambridge, v. 104, p. 722-725, 2000.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology,** Palo Alto, v. 43, p. 545–580, 2005.

BUÉE, M.; ROSSIGNAL, M.; JAUNEAU, A.; RANJEVA, R.; BÉCARD, G. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor

partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interaction,** St. Paul , 13:693-698, 2000.

CAMPOS, M.L. Controle hormonal da defesa a herbivoria em tomateiro. 2009. 117p. Dissertaçao (Mestrado em Fisiologia e Bioquimica de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CAVAGNARO, T.R.; GAO, L.L.; SMITH, S.E; SMITH, P. Morfology of arbuscular mycorrhizas is inflenced by fungal identity. **New Phytologist,** London, v. 151, p. 469-475, 2001.

CARVALHO, R.F. Estudo da interação entre fitocromo e hormônios vegetais no controle do desenvolvimento. 2008. 107 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquimica de Plantas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CHEN, H.; JONES, D.; HOWE, G.A. Constitutive activation of jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolits intomato. FEBS Lettrs, Heidelberg, v. 580, p. 2540-2546, 2006.

COSTA, H.S.; RÍOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e â-1,3-glucanases em raízes de feijoeiro. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 57, p. 19-25, 2000.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.

DONG, X.; SA, J.A. Ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion Plant Biology,** New York, v. 1, p. 316-323, 1998.

DIAZ, J.; TEN HAVE, A.; VAN KAN, J.A. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p. 1341–1351, 2002.

DUGASSA, G.D.; VON ALTEN, H.; ACHONBECK, F. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on leaf of Linum usitatissimun L. infected by fubgal pathogens. Plant Soil, Dordrecht, v.185, p.173-182, 1996.

FEYS, B.J.F.; BENEDETTI, C.E.; PENFOLD, C.N.; TURNER, J.G. Arabidopsis mutantes selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen, **Plant Cell**, New York, v. 6, p. 751-759, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Brasília: CENARGEN, 1998. 220 p.

FINLAY, R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. **Mycologist**, v. 18, n. 2, p. 91-96, 2004.

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

GANGE, A.C. Species-specfic responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. **New Phytologist,** London, v. 150, p. 611-618, 2001.

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

GARCIA-GARRIDO, J.M.; LENDZEMO, V.; CASTELLANOS-MORALES, V.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG, H. Strigolactones, signal for parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, Berlin, v.19, p. 440-459, 2009.

GARCIA-GARRIDO, J.M.; MORCILLO, R.J.L.; RODRIGUEZ, J.A.M.; BOTE, J.A.; OCAMPO, J.A. 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, 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, p. 114-119, 2002.

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.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; BRECHENMACHER, L. Functional genomics of arbuscular mycorrhiza: decoding the symbiotic cell program. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 82, p. 1228-1234, 2004.

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

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**, Ottawa, v. 80, p. 695–720, 2002.

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

GUTJAHR, C.; PASZKOWSJI, U. Weights in the balance: jasmônico acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. **Molecular Plant-Microbe**, St. Paul, v. 22, p. 763-772, 2009.

HAUSE, B.; SCHAARSCHMIDT, S. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil0born microorganisms. **Phytochemistry,** Oxford, v. 70, p. 1589-1599, 2009.

HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. Plant Physiology, Rockville, v.130, p.1213-1220, 2002.

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

HE, Y.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D.F.; GAN, S. Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 876–884, 2002

HERRERA-MEDINA, M.J.; GAGNON H,; PICHE Y.; GARCIA-GARRIDO, J.M.; VIERHEILIG, H. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. **Plant Science,** Amsterdam, v. 164, p. 993-998, 2003.

HERRERA-MEDINA, M.J.; STEINKELLNER, S.; VIERHEILIG,H.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, London, v.175, p.554-564, 2007.

HERREA-MEDINA, M.J.; TAMAYO, M.I.; VIERHEILIG, H.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. **Journal of Plant Growth Regulation,** New York, v. 27, n. 3, p. 221-230, Sept. 2008.

HOWE, G.A. Jasmonates as signals in the wound response. **Journal of Plant Growth Regulation,** New York, v. 23, p. 223-237, 2005.

ISAYENKOV, S.; MROSK, C.; STENZEL, I.; STRACK, D.; HAUSE, B. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of Medicago truncatula reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. **Plant Physiology,** Rockville, v. 139, p. 1401–1410, 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 trifoliate orange roots. **J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.**, v. 65, 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**, v.30, p.310-322, 2007.

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B..; PERES, L. E.; LAMBAIS, M. R. Regulacao do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. R. Bras. Ci. Solo, Campinas, v33, p.1-16, 2009.

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

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany,** Ottawa, v. 73, suppl. 1, p.S533-S540, 1995.

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

LI, L.; ZHAO, Y.; McCAIG, B. C.; WINGERD, B. A.; WANG, J.; WHALON, M. E.; PICHERSKY, E.; HOWE, G. A. The tomato homolog of coronatine-insensitive1 is required for maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense response, and glandulas trichome development. **The Plant Cell,** Baltimore, v.16 p.126-143, 2004.

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

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

LÓPEZ-RÁEZ, J.A.; VERHAGE, A.; FERNANDEZ, I.; GARCIA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FLORS, V.; POZO, M. J. Hormonal and transcriptional profiles highlight commom and differential host response to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipipn pathway. **Journal of Experimental Botany**, New York, v. 61, p. 2589-2601, 2010.

LORENZO, O.; SOLANO, R. Molecular players regulationg the jasmonate signaling network. **Plant Biology,** New York, v.8, p.532-540, 2005.

LUDWIG-MÜLLER, J. Hormonal balance in plants during colonization by mycorrhizal fungi. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS JR., D.D. (Ed.). **Arbuscular mycorrhizas:** physiology and function. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 263–285.

LUDWIG-MULLER, J.; BENNETT, R.N.; GARCIA-GARRIDO, J. M.; PICHÉ, Y.; VIERHEILI, H. Reduced arbuscular mycorrhizal root colonization in tropaeolum majus and carica papaya after jasmônico acid application can not be attributed to increase glucosinolate levels. **Journal of Plant Physiology,** Rockville, v.159, p.517-523, 2002.

MARSH, J. F.; SCHULTZE, M. Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. **New Phytologist,** London**,** v150, p.525-532, 2001.

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

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

McKEON, T.A.; YANG, S.F. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES PJ. (Ed.). **Plant hormones and their role in plant growth and development.** Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 94-112.

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**, Berlin, v. 222, p. 709-715, 2005.

MOONS, A,; PRINSE, E.; BAUW, G,; VAN MONTAGU, M. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonatos on salt strss-inducible transcripts in rice roots. The Plant Cell, Baltimore, v. 9, p. 2243-2259, 1997.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

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

PARNISKE, M. Molecular genetics, of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Current Opinion in Plant Biology, Berlin, v.7, p.414-421, 20004

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

POCERL, 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, p. 1743-1750, 2004.

POZO, M.J.; AZCÓN-AGUILAR, C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. **Plant Biology,** New York, v. 10, p. 393-398, 2007.

REGVAR, M.; GOGALA, N.; ZALAR, P. Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. **New Phytologist,** London, v. 134, p. 703-707, 1996.

REINHARDT, D. Programming good relations-development of the arbuscular mycoorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology,** London, v. 10, p. 98-105, 2007.

RIEDEL, T.; GROTEN, K.; BALDWIN, I. T. Symniosis between Nicotiana attenuata and Glomus intraradices: ethylene plays a role, jasmonic acid does not. **Plant, Cell and Environment,** Nottinghan, v. 31 p. 1203-1213, 2008.

ROJO, E.; SOLANO,; SÁNCHEZ-SERRANO, J. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. **Journal of Plant Growth Regulation,** New York, v. 22, p. 82-98, 2003.

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

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual III. S.1. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomero3mycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research,** New York, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, Dec. 2001.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v. 118, p. 87-93, 1991.

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

SMITH II, J.L.; HARE, D. Spectral properties, gas exchange, and water potential of leaves of glandular and non-glandular trichomes types in Datura wrigthii (solanacea). **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, p. 267-273, 2004.

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

STRASSNER, J,; SCHALLER, F.; FRICK, UB.; HOWE, G.A.; WEILLER, E.W.; AMRHEIN, N.; MACHEROUX, P.; SCHALLER, A. Characteriation and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals diferrential roles of octadecaboide byosynthesis in the local versus the systemic wound response. The Plant Journal, Oxfor, v. 32, p. 585-601, 2002.

STUMPE, M.; CARSJENS, J. G.; STENZEL, I.; GOBEL, CORNELIA.; LANG, I.; PAWLOWSKI, K.; HAUSE, B.; FEUSSNER, I. Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of medicago truncatula. **Phytochemistry,** Oxford, v.66, p. 781-791, 2005.

TEJEDA-SARTORIUS, M.; DE LA VEGA, O.M.; DELANO-FRIER, J.P. Jasmonic acid influences mycorrhizal colonization in tomato plants by modifying the espression of genes involved in carbohydrate partitioning. **Physiologia Plantarum,** Kobenhavn, v. 133, p. 339-353, 2008.

THOMMA, B.P.; PENNINCKX, I.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. **Current Opinion Immunology,** London, v. 13, p. 63–68, 2001.

THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; PENNINCKX, I.A.M.A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Plant Biology,** New York**,** v. 95, p. 15107-15111, 1998.

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 descumtase, catalase and peroxidase. **Acta Physiol Plant**, v.31, p.249-260, 2009.

VIERHEILIG, H.; PICHÉ, Y. Signaling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. In: BUSLIG, B.; MANTHEY, J. (Ed.). **Flavonoids in cell functions.** New York: Kluwer Academic, 2002. p. 23-39.

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

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

WASTERNACK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH. The wound response in tomato – role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology.** Stuttgart, v. 163, p. 297-306, 2006.

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

ZHANG, M.; YUAN, B.; LENG, PING. The role of ANA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. **Journal of Plant Physiology.** Stuttgart, v.60, p.1579-1588, 2009.

ZIEGLER, J.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; HAMBER, M,; GRIMM, R.; GANAL, M.; WASTERNACK, C. Molecular cloning of allene oxidase cyclase. The enzyme establidhing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonatos. The Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 275, p. 19132-19138, 2000.

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.