

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

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

**Agustín Zsögön**

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

**Piracicaba  
2006**

Agustín Zsögön  
Bacharel em Genética

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

Orientador:  
Prof. Dr. **LÁZARO EUSTÁQUIO PEREIRA  
PERES**

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

**Piracicaba**  
**2006**

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

Zsögön, Agustín

Análise do desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de  
tomateiros (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) / Agustín Zsögön. - - Piracicaba,  
2006.

48 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Estimulante de crescimento vegetal 2. Fósforo 3. Hormônio vegetal 4. Micorriza  
5. Mutação vegetal 6. Tomate I. Título

CDD 635.642

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho:

No Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, Prof. Lázaro Pereira Peres, Joni Esrom Lima, Rogério Falleiros Carvalho, Lilian Pino-Nunes, Simone Pacheco Lombardi, Fernando Pioto, Ricardo Fornazier e Romeu.

No Laboratório de Microbiologia do Solo, Prof. Márcio Rodrigues Lambais, Simão Lindoso de Souza, Adriana Sturion Lorenzi e Daniele Takahashi.

No Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (CENA), Prof. Antonio Figueira, Vagner A. Benedito, Jeanne M. Machado e Danielle Camargo Scoton.

Agradeço também a minha família e a Ana Clarissa Negrini, Cristian Ledesma, Helen Joslim, Reginaldo Viana Cunha, Carlos Anselmo, Paulo Dantas da Gama, Allan Veltrone, Rogério Haruo Sakai, João Manoel Galera, Eliane Seiko, Bruno Setani, Ezequiel Ale, Cristian Corio, Maximiliano Maronna, Diego Reartes, Esteban e Luciana González, Alejandro Toro e Elizabeth Werner, Lorena Sereno e Alfredo Suárez, Carlos Moldes e Soraya Kiriachek pelo constante apóio e amizade.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 DESENVOLVIMENTO.....	9
2.1 Revisão bibliográfica.....	9
2.1.1 Aspectos gerais das micorrizas arbusculares.....	9
2.1.2 Controle do desenvolvimento da simbiose .....	11
2.1.3 O papel dos hormônios vegetais na formação de MAs .....	13
2.1.4 Modelo vegetal para estudo da simbiose.....	16
2.2 Material e métodos .....	17
2.2.1 Material vegetal.....	17
2.2.2 Instalação do experimento e condições de crescimento .....	17
2.2.3 Determinações de porcentagem de colonização, massa seca e teor de nutrientes.....	20
2.2.4 Observações anatômicas e morfológicas.....	21
2.2.5 Análises de expressão genica .....	21
2.3 Resultados.....	22
2.3.1 Colonização micorrízica .....	22
2.3.2 Observações anatômicas e morfológicas.....	25
2.3.3 Análises de biomassa.....	27
2.3.4 Análises de expressão gênica .....	30
2.3.5 Dosagem de nutrientes .....	31
2.4 Discussão .....	31
3 CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS .....	36
APÊNDICES .....	45

## RESUMO

### **Análise do desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom)**

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito que a alteração na sensibilidade ou metabolismo hormonal em uma planta hospedeira poderia ter sobre o desenvolvimento de micorrizas arbusculares (MAs). Para tal, uma coleção de mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) introgrididos na cultivar miniatura Micro-Tom foi inoculada com o fungo *Glomus clarum*, em dos níveis de P no substrato. Foram realizados 3 experimentos, com os genótipos *Never ripe* (parcialmente insensível ao etileno), *epinastic* (superprodutor de etileno), *bushy root* (parcialmente insensível a citocinina), *diageotropica* (parcialmente insensível a auxina), *procera* (supersensível a giberelina) e *notabilis* (deficiente em ABA). Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de colonização micorrízica, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz em condições de P suficiente e insuficiente. Com os genótipos que apresentaram maiores alterações no desenvolvimento de MAs, *Never ripe* e *epinastic*, foram conduzidas análises morfológicas por meio de microscopia de luz, dosagem de P na parte aérea e estudos de expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real (PCR Real-Time). Concluiu-se que, nas condições do presente trabalho, o grupo hormonal que mostrou a maior influencia sobre a formação de MAs foi o etileno, sendo que o seu efeito parece ser tanto estimulatório quanto inibitório. Contudo, os resultados de expressão de genes de defesa não permitem explicar as diferenças observadas.

Palavras-chave: micorrizas arbusculares, *Lycopersicon*, Micro-Tom, fósforo, hormônios, mutantes, etileno.

## ABSTRACT

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

The aim of the present work was to study the effect that alterations in hormonal sensitivity and metabolism in a host plant could have in the development of arbuscular mycorrhizae (AM). In this regard, a series of hormone-related mutants introgressed in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom were inoculated with the fungus *Glomus clarum*, in two different levels of substrate P. Three experiments were performed, using the genotypes *Never ripe* (partially insensitive to ethylene), *epinastic* (ethylene overproducer), *bushy root* (partially insensitive to cytokinin), *diageotropica* (partially insensitive to auxin), *procera* (gibberellin hypersensitive) and *notabilis* (ABA-deficient). The following parameters were assessed: mycorrhizal colonization percentage, shoot and root dry mass, under conditions of either sufficient or insufficient P on the substrate. Further analyses, such as root morphology, P dosage and gene expression quantification (through Real-Time PCR), were performed on the genotypes which presented the most alterations in mycorrhizal development, namely *Never ripe* and *epinastic*. It was concluded that the hormone showing most influence on AM formation was ethylene. Its effect appears to be either stimulatory or inhibitory. In any case, defense gene expression alone could account for the observed differences.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, *Lycopersicon*, Micro-Tom, phosphorus, hormones, mutants, ethylene.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA = ácido abscísico

ACC = ácido aminociclopropano-carboxílico

AIA = ácido indol-3-acético

*brt* = mutante *bushy root*

*epi* = mutante *epinastic*

FMA = fungos micorrízicos arbusculares

GAPDH = gliceraldeído fosfato desidrogenase

Gc = *Glomus clarum*

IBA = ácido indol-3-butírico

MA = micorrizas arbusculares

MT = cultivar Micro-Tom

n.i. = não inoculado

*not* = mutante *notabilis*

*Nr* = mutante *Never ripe*

P = fósforo

PCR = reação em cadeia da polimerase

*pro* = mutante *procera*

ZR = zeatina ribosídeo



## 1 INTRODUÇÃO

As micorrizas arbusculares (MAs) são uma simbiose mutualística que contribui na captação de P, assim como outros nutrientes e água pelas raízes de plantas vasculares (SMITH; READ, 1997). Embora apresente grande importância na agricultura, pouco se conhece sobre a sinalização envolvida na formação desta associação planta-fungo. Sabe-se que um dos principais sinalizadores na formação da simbiose são os hormônios vegetais, porém, até o presente não tem sido realizados estudos conclusivos sobre o papel específico de cada grupo hormonal. No sistema modelo *Arabidopsis* existe uma ampla coleção de mutantes hormonais, mas esta espécie, assim como todos os membros da família Brassicaceae, não é formadora de MAs. A cultivar miniatura de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) possui numerosas vantagens que fazem dela o material eleito para se estudar processos fisiológicos e vias de sinalização relacionadas especificamente com o desenvolvimento de MAs (MEISSNER et al., 1997). Várias mutações relacionadas com biossíntese e metabolismo de hormônios foram introgrididas nessa cultivar, e podem ser aproveitadas para desvendar vias de sinalização envolvidas na formação de MAs (LIMA et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de MAs em mutantes relacionados a metabolismo e sensibilidade de hormônios vegetais. Com isto pretende-se obter informação sobre estes compostos no desenvolvimento de MAs. Para tanto, populações de mutantes bem caracterizados foram inoculadas com uma espécie de fungo micorrízico e posteriormente foram analisadas para avaliar o efeito das mutações sobre diversos aspectos da formação de MAs.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão bibliográfica**

#### **2.1.1 Aspectos gerais das micorrizas arbusculares**

Quando as plantas começaram a colonizar o ambiente terrestre, 450-500 milhões de anos atrás, elas tiveram que se digladiar com as duas grandes dificuldades de todos os seres vivos: a busca por água e nutrientes. Sem dúvida, a história evolutiva de todos os vegetais está relacionada com a superação destas duas dificuldades. Hoje é sabido que as plantas pioneiras na ocupação do ambiente terrestre, que não possuíam raízes verdadeiras, conseguiram sair do ambiente aquático graças a uma associação simbiótica com fungos filamentosos, chamada de micorrizas arbusculares (MAs) (SIMON; LEVESQUE; LALONDE, 1993; REMY et al., 1994). As MAs são caracterizadas pelo crescimento inter- e intracelular das hifas de fungos do Phylum Glomeromycota (SCHÜSSLER et al., 2001) no tecido cortical das raízes da maioria das espécies vegetais, e pela diferenciação de hifas intracelulares terminais em estruturas semelhantes a haustórios, chamadas arbúsculos (BONFANTE-FASOLO, 1984), os quais são estruturas efêmeras, de ciclo curto (4-5 dias), responsáveis pela troca bidirecional de nutrientes entre os simbioses (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Esta associação tem se conservado em todas as subseqüentes radiações evolutivas das plantas (REDECKER; MORTON; BRUNS, 2000). Aproximadamente 90% das espécies vegetais, incluindo angiospermas, pteridófitas, gimnospermas e os gametófitos de plantas inferiores como briófitas e licopódios, apresentam MAs no seu estado natural. A condição não micorrizica é, portanto, um caráter derivado, resultante da perda, ou supressão, da capacidade genética de desenvolver a simbiose (FITTER; MOYERSOEN, 1996). Algumas das famílias não formadoras de MAs mais importantes são Brassicaceae, Cyperaceae, Commelinaceae e Urticaceae. A condição não micorrizica é mais comum em ambientes perturbados e úmidos (PEAT; FITTER, 1993) onde a falta de competição pelos nutrientes minerais e a sua maior mobilidade, respectivamente, provavelmente selecionaram contra a associação micorrizica (FITTER; MOYERSOEN, 1996).

Todos os fungos micorrizico-arbusculares (FMAs) são simbioses obrigatórios incapazes de vida livre. Durante o transcurso da evolução, o fungo pode ter transferido funções essenciais para o genoma da planta, trocando assim a capacidade de replicação independente pelo nicho ecológico da raiz, que lhe forneceu proteção contra condições adversas no solo, parasitismo e predação (BRUNDRETT, 2002). Fungos micoparasíticos similares aos que existem hoje em dia estavam

presentes nos solos Paleozóicos (HASS et al., 1994). As plantas terrestres primitivas, por sua vez, cresciam em um ambiente com abundante luz solar e estavam expostas a uma atmosfera com concentrações de CO<sub>2</sub> muito maiores que as atuais (RAVEN; EDWARDS, 2001), mas eram estruturalmente fracas. Tais plantas deviam ser, portanto, muito atraentes para os fungos do solo. Os primeiros fungos endofíticos devem ter começado por colonizar os espaços intercelulares sem fornecer benefício algum para as plantas, mas a seleção natural favoreceu combinações planta-fungo mutualísticas (BRUNDRETT, 2002).

A base do mutualismo nas MAs é a transferência de carbono da planta para o fungo e de nutrientes minerais (principalmente fósforo e zinco) do fungo para a planta. A taxa fotossintética líquida das plantas colonizadas é maior, e elas apresentam consideráveis alterações na relação fonte-dreno: até 20% do carbono pode ser alocado para as raízes durante uma associação micorrízica (DOUDS; JOHNSON; KOCH, 1988; GRAHAM, 2000; TINKER; DURALL; JONES, 1994). Existem evidências de que o micélio interno do fungo pode absorver e utilizar hexoses, principalmente glicose, mas não sacarose (SCHACHAR-HILL et al., 1995; SOLAIMAN; SAITO, 1997). A sacarose deve ser, portanto, hidrolisada nas interfaces simbióticas por uma invertase de parede e os monossacarídeos poderiam ser captados pelo fungo através de mecanismos dependentes de ATP e bombas de prótons, mas ainda não existem provas para confirmar esta hipótese. Já a translocação de fósforo para a planta ocorre contra um elevado gradiente de concentração, pois a concentração dentro das células vegetais (1 a 10 mM) é ~10.000 vezes maior que na solução do solo (RAUSCH; BUCHER, 2002). Transportadores de fósforo de alta afinidade já foram identificados nas hifas do fungo (HARRISON; VAN BUUREN, 1995) e na membrana peri-arbuscular das células vegetais (HARRISON; DEWBRE; LIU, 2002; RAUSCH et al., 2001; ROSEWARNE et al., 1999), porém, ainda não é conhecida a proteína responsável pelo efluxo de fósforo do fungo para o apoplasto na interface arbuscular. Em todos os casos, o mecanismo envolvido seria o co-transporte com prótons, requerendo o funcionamento de uma proteína ATPase nas membranas vegetal e fúngica (RAUSCH; BUCHER, 2002).

Esta simbiose pode conferir outros benefícios adaptativos para as plantas, que também são de importância agrônômica, tais como resistência a microorganismos patogênicos (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996; FILION, ST. ARNAUD, FORTIN, 1999; GANGE, 2001) ou proteção contra estresse hídrico (MARULANDA et al., 2003; PORCEL et al., 2004; RUIZ-LOZANO et al.,

2001). Os mecanismos pelos quais estes efeitos são produzidos ainda estão longe de serem compreendidos, mas com o aprofundamento dos conhecimentos sobre a simbiose, eventualmente será possível a sua manipulação para melhorar os benefícios agronômicos por ela conferidos.

### **2.1.2 Controle do desenvolvimento da simbiose**

A compatibilidade entre plantas e fungos é um fenômeno amplamente difundido e antigo. Mais de 90% das plantas terrestres são capazes de formar MAs e evidências fósseis (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000; REMY et. al, 1994) e moleculares (SIMON; LEVESQUE; LALONDE, 1993) sugerem que simbioses deste tipo já existiam há mais de 400 milhões de anos. Análises de relógio molecular (que permitem inferir a data aproximada de aparecimento de linhagens particulares a partir das taxas de alteração na seqüência de DNA em diferentes organismos) com dados de seqüência de rDNA, mostram que uma considerável radiação filogenética do Phylum Glomeromycota aconteceu concomitantemente à colonização do ambiente terrestre pelas plantas (REDECKER; MORTON; BRUNS, 2000) Conseqüentemente, a capacidade das plantas de estabelecer a simbiose deve estar sob controle de mecanismos que tenham sido conservados durante o processo evolutivo. Essa compatibilidade implica que o reconhecimento seletivo entre microorganismos benéficos e daninhos, assim como os determinantes genéticos essenciais são comuns a uma grande parte do reino vegetal (SMITH; READ, 1997).

O primeiro passo para o desenvolvimento da simbiose é o reconhecimento mútuo da planta e o fungo. A raiz libera moléculas sinais que estimulam a ramificação das hifas (BUÉE et al., 2000), e o fungo responde liberando um outro sinal que induz ativação de genes específicos da simbiose na planta (CHABAUD et al., 2002; KOSUTA et al., 2003). Após a colonização da superfície radicular, as hifas penetram na raiz através de uma abertura entre as paredes anticlinais de duas células epidérmicas adjacentes. Este passo parece estar completamente sob o controle da planta e é provavelmente mediado pela produção e liberação localizada de enzimas pectinolíticas. As hifas fúngicas formam então apressórios para ingressar à exoderme e ao córtex externo da raiz. Isto é seguido de uma rápida proliferação de hifas no apoplasto do córtex, ao longo do eixo longitudinal da raiz (PARNISKE, 2004). Conforme o fungo vai crescendo através do apoplasto, as hifas se ramificam para penetrar nas células corticais internas e começar a formação de arbúsculos. Foi demonstrado que o nível de transcritos para  $\beta$ -1,4-glucanases e transportadores de fosfato se encontra aumentado em células contendo arbúsculos (HARRISON; DEWBRE; LIU, 2002; LIU et

al., 2003). A existência de mutantes específicos sugere que o grau de colonização se encontra sob o controle da planta (PARNISKE, 2004). Isto é coerente com a observação de que não ocorre colonização de tecidos meristemáticos e vasos condutores. Tem sido observado também que nem todas as células corticais são infectadas, e a diferenciação de hifas terminais em arbúsculos ocorre apenas em algumas das células infectadas. No entanto, os fatores atuantes nesse controle são desconhecidos. A regulação do desenvolvimento de MAs e sua funcionalidade podem ser afetadas também pelas condições edafoclimáticas (SMITH; READ, 1997).

Um fator determinante do grau de colonização é a disponibilidade de fosfato na solução do solo: quando não se constitui em um fator limitante para o crescimento da planta, as raízes excluem ou limitam a infecção pelos FMAs. As bases genéticas, moleculares e fisiológicas deste controle são desconhecidas (PARNISKE, 2004), mas os mecanismos pelos quais a planta restringe a formação das MAs parecem depender tanto de fatores nutricionais quanto não nutricionais, e o mais provável é que exista uma interação entre ambos (SCHWAB; MENGE; TINKER, 1991). Foi sugerido que a capacidade das plantas de regular a partição e alocação de carboidratos exerce um papel fundamental no controle do processo de infecção (BLEE; ANDERSON, 1998; MacARTHUR; KNOWLES, 1992). Assim, a supressão da colonização em condições de alta disponibilidade de fosfato pode se dever a uma limitação na disponibilização de fotossintatos para a nutrição do fungo e/ou à ativação do sistema de defesa da planta, sendo que ambos processos são, sabidamente, controlados por hormônios vegetais. Dentre as proteínas de defesa vegetal com um papel aparente no controle do crescimento intrarradicular de FMAs, a regulação diferencial de genes codificando quitinases (EC 3.2.1.14) e  $\beta$ -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39) tem apresentado resultados interessantes. As quitinases são maioritariamente endoquitinases, enzimas que degradam hidroliticamente a quitina, um polímero de N-acetilglucosamina, começando desde dentro do polímero e não pelo extremo (GRAHAM; STICKLEN, 1994). As  $\beta$ -1,3-glucanases são hidrolases que catalisa a reação de hidrólise das ligações  $\beta$ -D-glicosídicas do  $\beta$ -1,3 glucano.

Apesar de serem moduladas durante a formação de MAs, pouco se conhece sobre as funções das enzimas acima mencionadas no desenvolvimento da simbiose, sendo sugerido que estejam envolvidas no controle do crescimento fúngico intrarradicular (LAMBAIS; MEHDY, 1995). Com base na expressão diferencial de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases em MAs, um modelo hipotético para explicar a regulação e o papel dessas proteínas durante o processo de colonização intrarradicular foi proposto por Lambais e Mehdy (1995). Neste modelo, dois tipos de mecanismos de sinalização

diferentes seriam responsáveis pela indução localizada de genes de defesa específicos, tais como endoquitinase ácida PR4 e  $\beta$ -1,3-endoglucanase EG488, e pela supressão sistêmica da expressão de genes codificando quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e enzimas envolvidas na via biossintética de fenilpropanóides. Na indução localizada, uma molécula sinal, produzida em resposta à infecção e capaz de elicitar respostas de defesa vegetal, teria sua atividade modulada pelo nível de fosfato e regularia genes diferentes, dependendo de sua atividade. Alternativamente, diferentes moléculas sinais (elicitores) seriam produzidas em condições de alto e baixo fosfato, agindo independentemente. No caso da supressão sistêmica, possíveis mediadores dessa resposta seriam os hormônios vegetais (HARRISON, 1999; SCHWAB et al., 1991). De fato, os níveis de fitormônios se encontram alterados nas plantas colonizadas com fungos MAs (SHAUL-KEINAN et al., 2002).

### **2.1.3 O papel dos hormônios vegetais na formação de MAs**

Os hormônios vegetais (auxina, ácido abscísico –ABA–, citocinina, etileno e giberelina) são moléculas que agem como reguladores do desenvolvimento das plantas (DAVIES, 1995) e, dado que as MAs produzem consideráveis alterações morfológicas e fisiológicas nas plantas colonizadas, é muito provável que possuam efeitos importantes no controle da colonização micorrízica (BARKER; TAGU, 2000).

Vários trabalhos têm avaliado os níveis de auxina em plantas micorrizadas. Ensaio com ELISA e o teste de formação de etileno (mediada por auxina) em epicótilos de ervilha provaram que os níveis de auxina não diferem dos encontrados em plantas controle (DANNEBERG et al., 1992). Mais recentemente, dosagens através de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) em raízes micorrizadas de *Allium porrum* (TORELLI et al., 2000) e *Nicotiana tabacum* (SHAUL-KEINAN et al., 2002), confirmaram esses resultados. Os níveis de formas conjugadas das auxinas ácido indol-3-acético (AIA) e indol-3-butírico (IBA) também não apresentaram variação significativa em raízes de *Zea mays* colonizadas por *G. intraradices* (FITZE et al., 2005). Um outro trabalho em *Z. mays* mostrou que a colonização micorrízica induziu um aumento significativo na porcentagem de raízes laterais finas 10 dias após a inoculação, um fenótipo que pode ser reproduzido por aplicação exógena de auxina (KALDORF; LUDWIG-MÜLLER, 2000). Esses autores dosaram diferentes tipos de auxina e evidenciaram um aumento na concentração de IBA, assim como uma maior biossíntese deste composto. Porém, 30 dias após a inoculação os níveis de IBA tinham retornado ao normal (KALDORF; LUDWIG-MÜLLER, 2000). Os autores propuseram

que o IBA poderia facilitar a colonização pelo fungo aumentando o número de raízes finas/laterais durante as primeiras fases de crescimento da planta.

No caso de giberelina, foi demonstrado que existem alterações significativas nos níveis endógenos deste hormônio em plantas micorrizadas, no entanto, os resultados são contraditórios. Utilizando bioensaios para detectar atividade do tipo GA<sub>3</sub> em *Bouteloua gracilis* e *Linum usitatissimum*, Allen, Moore e Christensen (1982) e Dugassa, von Alten e Schönbeck (1996), respectivamente, acharam um nível aumentado de giberelina na parte aérea das plantas e, no caso do trabalho de Allen, Moore e Christensen, um nível reduzido nas raízes. Porém, por meio da técnica de GC-MS, Clapperton, Koshioka e Pharis (1985) e Shaul-Keinan et al. (2002) quantificaram GA<sub>1</sub>, a giberelina com maior atividade biológica, e descobriram níveis maiores em raízes infectadas do que em raízes controle, mas nenhuma alteração significativa na parte aérea. A aplicação exógena de ácido giberélico aumenta a expressão de genes para invertases solúveis e de parede (WU et al., 1993), portanto foi sugerido que as altas concentrações de giberelina observadas nas raízes micorrízicas estejam relacionadas ao requerimento de carbono pelo fungo (BLEE; ANDERSON, 1998, SHAUL-KEINAN et al., 2002).

A citocinina tem sido um dos hormônios mais investigados em relação à formação de MAs. No entanto, não existem provas inequívocas sobre o seu papel na simbiose, apenas evidências circunstanciais (FRANKENBERGER; ARSHAD, 1995). Allen, Moore e Christensen (1980) foram os primeiros a relatarem uma elevação na atividade de citocinina nas folhas e raízes de plantas micorrizadas, através do bioensaio de tecido de calo de *Glycine max*. Numerosos trabalhos posteriores confirmaram estes resultados (EDRISS et al., 1984, DIXON et al., 1988, DIXON, 1989). Recentemente, Shaul-Keinan et al. (2002) avaliaram o conteúdo de citocininas em plantas de *N. tabacum* por meio da técnica de cromatografia gasosa de alta performance (HPLC) seguida de raioimunoensaio (RIA), e mostraram que, em baixas concentrações de P, as concentrações de compostos do tipo isopentenil adenosina (iPA) são maiores em raízes e folhas de plantas micorrizadas que nos controles não inoculados. Os mesmos autores também provaram que a presença de FMAs induziu novas formas de compostos do tipo zeatina ribosídeo (ZR) em plantas colonizadas, as quais não foram induzidas por fósforo em controles não micorrizados (SHAUL-KEINAN et al., 2002). Os níveis de ZR em raízes colonizadas de *Linum usitatissimum*, determinados por meio de ELISA, provaram ser menores no começo da infecção pelo FMA, e maiores quando a taxa de colonização micorrízica superava 60% (DRÜGE; SCHÖNBECK,

1992). O aumento do crescimento produzido pelo FMA nestas plantas foi invariavelmente precedido por um aumento nas concentrações de ZR. No mesmo trabalho foi descoberto que as plantas micorrízicas apresentam uma maior taxa fotossintética assim como um aumento na condutância estomática, quando comparado às plantas não inoculadas, sendo que já foi provado um efeito estimulatório da citocinina na abertura estomática (BLACKMAN; DAVIES, 1985), na síntese de clorofila e na atividade da enzima Rubisco (DAVIES, 1995). Os autores concluíram que o aumento do crescimento promovido pelos FMAs nas plantas colonizadas não é devido a fatores nutricionais, e sim ao aumento nos níveis de citocinina, que estimularam a abertura estomática, a síntese de clorofila e a atividade da Rubisco, aumentando assim a taxa fotossintética e a eficiência no uso da água (DRÜGE; SCHÖNBECK, 1992). Ainda não está claro se a citocinina em plantas micorrizadas é de origem vegetal ou fúngico. Existe na literatura apenas um trabalho sugerindo que os FMAs em cultivo axênico são capazes de sintetizar citocininas (BAREA; AZCÓN-AGUILAR, 1982), mas estes resultados nunca foram confirmados.

Muito pouco se conhece sobre a relação entre ABA e desenvolvimento de MAs. No já mencionado trabalho pioneiro em dosagens hormonais em plantas micorrizadas, Allen, Moore e Christensen (1982) mostraram concentrações levemente menores de ABA nas folhas e nenhuma alteração deste hormônio na raiz, aclarando que estes deviam ser considerados resultados tentativos, pois a eficiência dos procedimentos de extração foi muito baixa. Determinações de ABA através de ELISA em plantas micorrizadas mostraram níveis consideravelmente aumentados em comparação a raízes controle (DANNEBERG et al., 1992). Posteriormente foi provado que as hifas e esporos isolados do fungo *Glomus* sp. possuem concentrações de ABA uma ordem de magnitude superiores às de raízes de milho (ESCH et al., 1994).

O etileno é quase universalmente considerado um hormônio inibitório da formação de MAs (GUINEL; GEIL, 2002). Azcón-Aguilar, Rodriguez-Navarro e Barea (1981) foram os primeiros a relatar que o tratamento de duas espécies hospedoras de MAs (*Triticum vulgare* e *Medicago truncatula*) com ethrel, uma substância liberadora de etileno, diminuía a colonização pelo fungo *G. mossae* em proporção direta à concentração aplicada. Um efeito similar foi observado após o mesmo tratamento em *Glycine max* colonizada por *G. fasciculatum* (MORANDI, 1989). Estes resultados, porém, devem ser interpretados com precaução, pois o uso de ethrel como fonte de etileno possui limitações, a mais importante sendo a liberação concomitante de fosfato (ABELES, MORGAN e SALTVEIT 1992), que em si reduz a



colonização micorrízica (SMITH; READ, 1997). No entanto, a aplicação direta de etileno em concentrações de entre 0,6 e 5,5  $\mu\text{L}$  produziu os mesmos resultados para *Poncirus trifoliata* colonizada por *Gigaspora ramisporophora* (ISHII et al., 1996); *Pisum sativum* e *Allium porrum* colonizados por *Glomus aggregatum* (GEIL; PETERSON; GUINEL, 2001, GEIL; GUINEL, 2002). Curiosamente, uma concentração muito baixa (0,05  $\mu\text{L}$ ) de etileno resultou ter um efeito estimulatório na germinação dos esporos e crescimento das hifas de *Gigaspora ramisporophora* (ISHII et al., 1996). Existe também outra linha de evidência provando que os fungos micorrízicos podem alterar a produção de etileno na planta hospedadora. O trabalho mais importante neste sentido é o de MacArthur e Knowles (1992), que provaram uma diminuição da atividade ACC oxidase, uma enzima chave na biossintética do etileno, em raízes de *Solanum tuberosum* colonizadas por *Glomus fasciculatum*. A produção de etileno também foi reduzida pela colonização por *G. intraradices* na espécie ornamental *Antirrhinum majus* (BESMER; KOIDE, 1999). Assim, parece existir uma tendência indicando que a produção de etileno é limitada pela colonização fúngica na planta hospedadora. No entanto, outros trabalhos mostraram uma ausência de efeito das MAs sobre a produção de etileno (VIERHEILIG et al., 1994) e inclusive um aumento em *Linum usitatissimum* colonizado por *G. intraradices* (DUGASSA, VON ALTEN, SCHÖNBECK, 1996). A compreensão da função do etileno nas MAs ainda se encontra longe de ser completa, mas, ao menos uma parte das diferenças observadas pode ser devida a particularidades de cada espécie hospedadora, o que requer o desenvolvimento de um modelo para permitir a realização de estudos mais aprofundados.

#### **2.1.4 Modelo vegetal para estudo da simbiose**

Atualmente, o principal modelo vegetal para o estudo de diversos processos fisiológicos é *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*). 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, *Arabidopsis*, assim como todos os membros da família Brassicaceae, não forma simbioses 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 (LIMA et al., 2004), existem inúmeros mutantes monogênicos de tomateiro com alterações em diversas rotas metabólicas e de desenvolvimento (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). Entre as várias mutações já descritas em tomateiro, encontram-se mutantes com alterações no metabolismo ou na sensibilidade a hormônios do tipo ácido abscísico, giberelina, etileno, auxina e citocinina (Tabela 1).

As principais limitações para a utilização intensiva do tomateiro como modelo em abordagens genéticas de diversas questões fisiológicas são seu tamanho e duração do ciclo de vida, os quais, embora sejam relativamente pequenos, estão em franca desvantagem quando comparados aos de *Arabidopsis*. Levando-se em conta a vantagem da própria riqueza do germoplasma de tomateiro, há a possibilidade de se criar um sistema de estudo nessa espécie nos moldes do que se tem hoje em *Arabidopsis*. Desse modo, a cultivar miniatura de tomateiro (Micro-Tom, MT), proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis em vasos de apenas 50-100 mL de substrato, completando seu ciclo em 70-90 dias. Com essas características, a dita cultivar MT pode crescer em laboratório na mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (LIMA et al., 2004), o que faz dele um ótimo modelo para estudos com MAs.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Material vegetal**

Os parentais dos diversos mutantes com alterações no metabolismo/sensibilidade hormonal (Tabela 1) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Chetelat (TGRC - University of California, Davis, USA). A cultivar MT foi fornecida pelo Dr. A. Levy (Weizmann Institute of Science - Israel). As mutações hormonais foram introgrididas na cultivar MT em nosso laboratório (em fase de elaboração). O inóculo do fungo micorrízico *Glomus clarum* foi cedido pelo Dr. Marcio Rodrigues Lambais (LSN/ESALQ, Universidade de São Paulo).

### **2.2.2 Instalação do experimento e condições de crescimento**

A avaliação da formação de MAs foi feita nos mutantes relacionados a hormônios vegetais apresentados na Figura 1 e descritos na Tabela 1. Foram realizados três experimentos, divididos fatorialmente em tratamentos com P suficiente (PA) e deficiência de P (PB) no

substrato, com e sem inóculo de fungo micorrízico, para cada tipo de mutante. Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal (LCB/ESALQ, Universidade de São Paulo). O primeiro experimento, com o mutante *epinastic*, foi montado no dia 30/08/2004, o segundo, com o mutante *notabilis*, em 30/10/2004 e o último, com os genótipos *Never ripe*, *diageotropica*, *procera* e *bushy root* foi montado em 17/02/2005. As sementes foram semeadas em bandejas de 40x20 cm num substrato de vermiculita: Plantmax (1:1), adubado com 1g de NPK (10:10:10) e 4g de calcário por litro de substrato e após duas semanas transplantadas para vasos de Leonard (VINCENT, 1970; Figura 1A, B), com 350 ml de areia lavada e autoclavada por 1 h a 120°C, e 500 ml de água no compartimento inferior. A adubação foi realizada com solução de Hoagland completa com 0,1 mM (PB) ou 1 mM (PA) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , em duas aplicações semanais, de modo que a adubação fosfatada representou 4 ou 40 mg P  $\text{Kg}^{-1}$  de substrato, para PB e PA respectivamente (DAVID-SCHWARTZ et al., 2001).

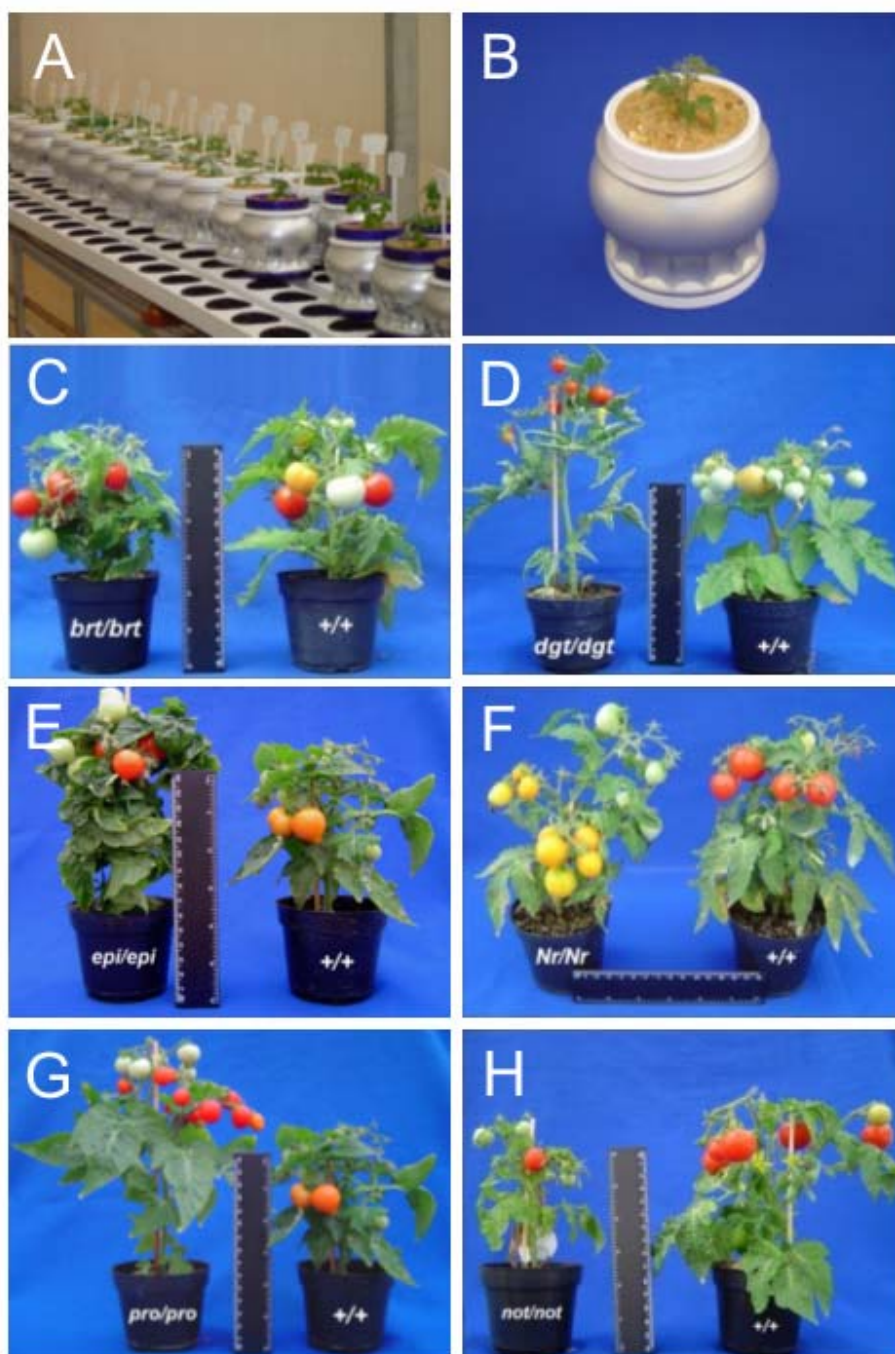


Figura 1 – Material vegetal utilizado no presente trabalho. (A) Visão geral das condições de crescimento na casa de vegetação; (B) Vaso de Leonard com planta de Micro-Tom; (C-H) fenótipo dos mutantes comparados com Micro-Tom (+/+): (C) mutante *bushy root* (*brt*); (D) mutante *diageotropica* (*dgt*); (E) mutante *epinastic* (*epi*); (F) mutante *Never ripe* (*Nr*); (G) mutante *procera* (*pro*); (H) mutante *notabilis* (*not*). A régua usada como escala tem 15 cm. Fotos C-H cortesia de Rogério F. Carvalho

O inoculo micorrízico utilizado foi solo com raízes colonizadas de *Brachiaria decumbens*, hifas e esporos do fungo *Glomus clarum*. Foram aplicados 10 g de inoculo por vaso. Os tratamentos foram arranjados em blocos casualizados, com oito repetições para os inoculados e três para os não inoculados. Após 35 dias se procedeu à colheita e separação do terço superior de raízes para avaliação de formação de micorrizas. O material radicular restante foi congelado de raízes a -80 °C para a posterior realização de ensaios moleculares.

Tabela 1 - Mutantes hormonais utilizados no presente trabalho

Mutante	Classe hormonal	Características morfológicas e função do gene correspondente	Referência
<i>diageotropica (dgt)</i>	Auxina	Planta anã, crescimento diageotrópico dos caules e raízes; raízes sem ramificação. Possivelmente defectivo para componente da via transdução de sinal de auxina.	(1)
<i>Never ripe (Nr)</i>	Etileno	Plântulas não apresentam tríplice resposta ao serem tratadas com etileno. Frutos não amadurecem totalmente. Defectivo para gene receptor de etileno.	(2)
<i>notabilis (not)</i>	ABA	Extremo murchamento das folhas sob estresse. Defectivo para gene que codifica enzima chave na quebra de carotenóides precursores de ABA	(3)
<i>procera (pro)</i>	GA	Folhas com borda contínua, caule bastante alongado. Excesso de resposta às giberelinas	(4)
<i>bushy root (brt)</i>	Citocinina	Planta de porte reduzido, muito ramificada, senescência acelerada. Pouco sensível a citocininas.	(5)
<i>epinastic (epi)</i>	Etileno	Epinastia severa, caules e pecíolos dilatados, raízes muito ramificadas. Superprodução de etileno.	(6)

(1) KELLY; BRADFORD, 1986; HICKS et al.,1989; (2) WIKINSON et al.,1995; (3) BURBIDGE et al.,1999; TAYLOR et al.,2000; (4) JONES, 1987;(5) em elaboração; (6) FUJINO et al.,1988; BARRY et al., 2001.

### 2.2.3 Determinações de porcentagem de colonização, massa seca e teor de nutrientes

As raízes foram colocadas em uma solução de KOH 10% a 90°C por 30 min e depois transferidas a uma solução de tinta QuInk (Parker) 5% e ácido acético 5% a 90°C durante 3 min (VIERHEILIG et al., 1998). A coloração foi interrompida com uma solução de ácido acético 5% e as raízes foram conservadas em lactoglicerol. A colonização foi quantificada pelo método de Giovannetti e Mosse (1980). Resumidamente, as raízes foram espalhadas em uma placa de Petri quadriculada e observadas em uma lupa a 40x. A intersecções entre raízes e linhas da quadricula foram avaliadas para a presença de estruturas fúngicas como hifas, arbúsculos o vesículas. Pelo

menos 100 intersecções foram contabilizadas para cada repetição. A parte aérea e uma pequena porção de raízes foram secadas em estufa a 60 °C e pesadas em uma balança analítica. A matéria seca da parte aérea foi moída e encaminhada para determinação dos teores de nutrientes no Laboratório de Análises Químicas do LSN/ESALQ (Universidade de São Paulo). Os dados de porcentagem de colonização foram normalizados antes da análise estatística mediante a transformação arcoseno. Para todas as variáveis analisadas aplicou-se o teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

#### **2.2.4 Observações anatômicas e morfológicas**

Com a finalidade de observar a morfologia das raízes, foram cultivadas plântulas de todos genótipos sob estudo. As sementes foram semeadas em bandejas de 40x20 cm num substrato de vermiculita: Plantmax (1:1), adubado com 1g de NPK (10:10:10) e 4g de calcário por litro de substrato. Após duas semanas desde a germinação, as plantas foram cuidadosamente retiradas do substrato, lavadas e fotografadas.

As raízes dos genótipos com diferenças significativas na porcentagem de colonização foram cortadas em fragmentos de 1 cm, montadas sobre porta-objetos e observadas em um microscópio Nikon Eclipse, a 40x e 100x de aumento e fotografadas com uma câmera Sony.

#### **2.2.5 Análises de expressão gênica**

Análises de PCR Real-Time foram realizadas para os genes *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *chi9* (quitinase classe I, acesso GenBank Z15140), *chi14* (quitinase classe II, Z15138), *TomPR-Q'a* ( $\beta$ -1,3-glucanase classe III ácida, X74905) e *TomPR-Q'b* ( $\beta$ -1,3-glucanase classe III básica, X74906). Os primers específicos para esses genes foram desenvolvidos no laboratório do Prof. Dr. Antonio Figueira (CENA/USP) utilizando programas específicos (Primer3, NetPrimer) para desenho e verificação de instabilidades dos primers (Tabela 2).

As reações foram conduzidas no termociclador RotorGene 3000 (Cobertt Research), contendo volume final de 10  $\mu$ L, tendo 5  $\mu$ L de 2X Platinum SYBR GREEN qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 0,8  $\mu$ L de cada um dos *primers* (iniciadores) *reverse* e *forward* e 1  $\mu$ L da diluição 1:10 de cDNA da amostra, com três repetições para cada amostra analisada. A incubação inicial da reação foi feita em 2 passos: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de

95°C por 15 seg e 60°C por 30 seg. No final da reação uma curva de desnaturação foi obtida de 72°C a 95°C, determinando a dissociação do produto de PCR. As análises foram realizadas utilizando o software Rotor-Gene Real-Time Analysis 6.0. A razão da quantidade de transcritos dos genes alvo para o gene referência (*GAPDH*) foi determinada segundo Pfaffl (2001), utilizando-se o genótipo MT como controle.

Tabela 2 - Sequência e tamanho de fragmento gerado pelos primers utilizados nas reações de PCR Real-Time

Gene	Primers	Tamanho	Referência
<i>TomPR-Q'a</i>	5'- TAA GGA ACA TTC AAA CCG CA -3' 5'- CCA ACC RCT CTC YGA TAC AA -3'	122 pb	(1)
<i>TomPR-Q'b</i>	5'- TGA GAA ACA TTC AGA ACG CG -3' 5'- CCA ACC RCT CTC YGA TAC AA -3'	383 pb	(1)
<i>Quitinase 9</i>	5'- GCT TTT GCT GTC TGC CTG T -3' 5'- GCC CTT CCT CCA GTA GTT TC -3'	196 pb	(2)
<i>Quitinase 14</i>	5'- TCA ATG GTG GAA TGG AAT G -3' 5'- CCT GCG TGA CAA AAT GGA -3'	256 pb	(2)

(1) DOMINGO; CONEJERO; VERA, 1994; (2) DANHASH et al., 1993.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Colonização micorrízica

Por limitações de espaço, os vários mutantes hormonais disponíveis (Figura 1C-H, Tabela 1) não puderam ser testados todos simultaneamente, mas em três experimentos independentes, repetindo-se o teste com o controle MT em todos os experimentos. Desse modo, no primeiro experimento foram testados os genótipos MT e *epinastic*; no segundo MT e *notabilis* e no terceiro MT, *diageotropica*, *bushy root*, *procera* e *Never ripe*.

No primeiro experimento, os resultados com o mutante superprodutor de etileno *epinastic* mostraram um nível de colonização consideravelmente reduzido em relação ao controle Micro-Tom (Figura 2). Na presença de um nível adequado de P, uma condição na qual a planta tende a impedir a penetração do fungo, o mutante, apesar de uma importante tendência à redução do nível de colonização, não mostrou uma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) com relação ao controle. No entanto, na condição de PB, a colonização foi significativamente menor no mutante (14,8% contra 45,9% no controle, Figura 2), sugerindo que o conhecido aumento da micorrização em condição de deficiência de P (SMITH; READ, 1997; Figura 2) seja promovida por uma redução na biossíntese ou na sensibilidade ao etileno.

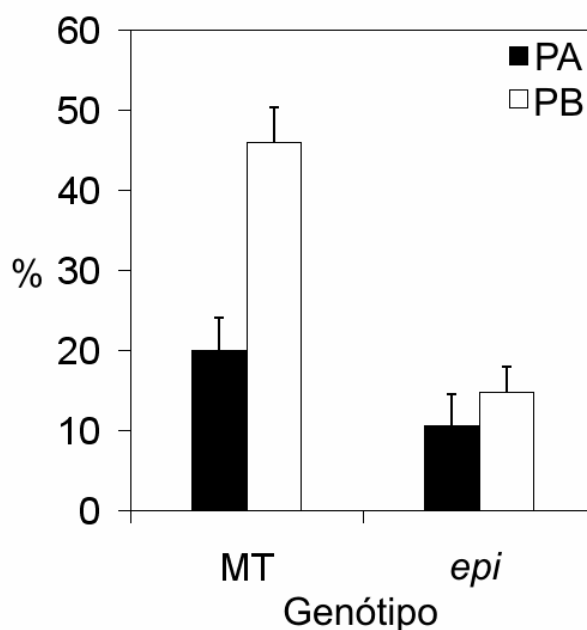


Figura 2 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e do mutante superprodutor de etileno *epinastic* (*epi*) inoculados com *Glomus clarum* e cultivados com 4 (PB) ou 40 (PA) mg P Kg<sup>-1</sup> de substrato. As plantas foram colhidas 35 dias após o plantio. Os dados são médias de 8 repetições. As barras representam o erro padrão da média

No ensaio com o mutante deficiente em ABA, *notabilis*, foi verificado que os baixos níveis de ABA associados a essa mutação (menos de 50% do nível normal, TAL, 1966) parecem não ter influenciado a formação de micorrizas, nas condições do presente trabalho. Desse modo, os valores de colonização registrados foram quase idênticos para o mutante e o controle (Figura 3), descartando um papel importante para o ABA no processo.



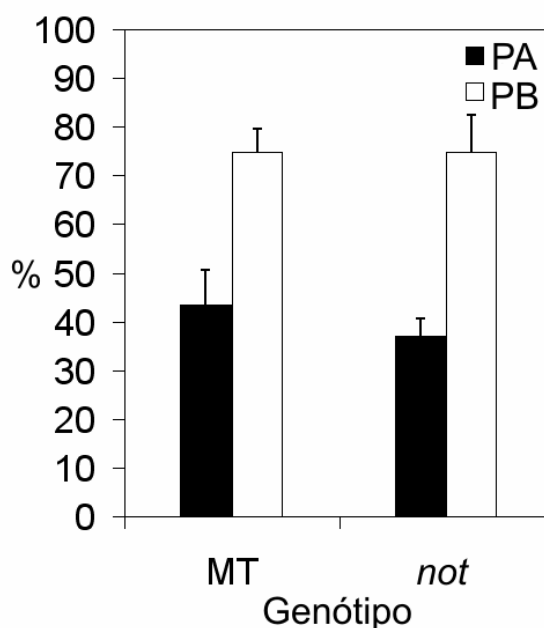


Figura 3 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e do mutante deficiente em ABA *notabilis* (*not*) inoculados com *Glomus clarum* e cultivados com 4 (PB) ou 40 (PA) mg P Kg<sup>-1</sup> de substrato. As plantas foram colhidas 35 dias após o plantio. Os dados são médias de 8 repetições. As barras representam o erro padrão da média

No terceiro experimento, o mutante insensível a etileno *Never ripe* apresentou uma significativa diminuição na colonização com relação ao controle; a porcentagem deste genótipo em PB foi de 67%, enquanto que a do controle foi 84% (Figura 4). Em PA também se observou uma redução no nível de colonização nesse genótipo, mas esta diferença, contrariamente àquela na condição de PB, não foi significativa no nível de  $P < 0,05$ . Nos mutantes *bushy root* e *diageotropica*, pouco sensíveis a citocinina e auxina, respectivamente, o desenvolvimento do fungo parece não ter sido tão inibido quanto no controle na condição de PA. Ambos genótipos mostraram níveis de colonização consideravelmente superiores aos do Micro-Tom: 60% no caso de *bushy root* e 58% em *diageotropica* (Figura 4), embora estas diferenças não tenham valores significativos no teste t ( $P < 0,05$ ). No caso do mutante *procera*, o qual possui sensibilidade aumentada a giberelinas, a porcentagem de colonização mostrou ser próxima ao controle MT em ambas condições nutricionais.

Em resumo, pode se dizer que na presença de *G. clarum*, e tanto na condição de P suficiente quanto de deficiência, os únicos mutantes que apresentaram níveis de colonização semelhantes

aos de Micro-Tom foram aqueles relacionados aos hormônios ABA e giberelina, ou seja, *notabilis* e *procera*. Desse modo, esses mutantes não foram utilizados em análises posteriores. Os resultados de colonização aqui apresentados, e cujos dados originais encontram-se tabulados nos Apêndices A-C, sugerem um envolvimento dos hormônios etileno, auxina e citocinina no processo de desenvolvimento de micorrizas arbusculares.

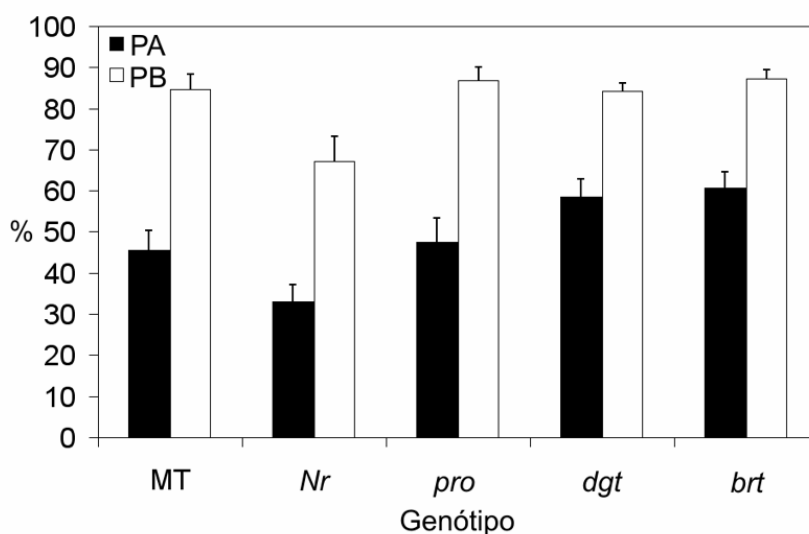


Figura 4 – Porcentagem de colonização micorrízica em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e dos mutantes *Never ripe* (Nr, insensível ao etileno), *procera* (pro, hipersensível a giberelina), *diageotropica* (dgt, insensível a auxina) e *bushy root* (brt, insensível a citocinina), inoculados com *Glomus clarum* e cultivados com 4 (PB) ou 40 (PA) mg P Kg<sup>-1</sup> de substrato. As plantas foram colhidas 35 dias após o plantio. Os dados são médias de 8 repetições. As barras representam o erro padrão da média

### 2.3.2 Observações anatômicas e morfológicas

A morfologia das raízes variou para cada genótipo da seguinte maneira: *diageotropica* apresenta raízes reduzidas e pouco ramificadas, mas não o crescimento diageotrópico característico observado em outras cultivares de *L. esculentum* (MUDAY; LOMAX; RAYLE, 1994); *bushy root* apresenta raízes mais ramificadas, enquanto que em *notabilis* e *Never ripe* elas são consideravelmente mais compridas que em Micro-Tom. O mutante *epinastic* possui raízes um pouco mais ramificadas e engrossadas que o controle, mas não foi observada a redução no comprimento radicular previamente descrita para este fenótipo (FUJINO et al., 1988).

Utilizando microscopia de luz para estudar mais detalhadamente as raízes dos genótipos com baixa colonização em PB, *Never ripe* e *epinastic*, foram detectados neste último numerosas alterações morfológicas, características de mutantes não formadores de micorrizas (BARKER et

al., 1998), tais como abundantes hifas externas com ausência de colonização interna (Figura 6B) e apressórios proeminentes com hifas sub-epidérmicas abortadas (Figura 6C, D). De modo coerente, foram observadas poucas vesículas nas raízes colonizadas de *epinastic*, as quais foram abundantes em MT (Figura 6A). No mutante *Never ripe* não foram observadas diferenças morfológicas conspícuas além do baixo grau de colonização.

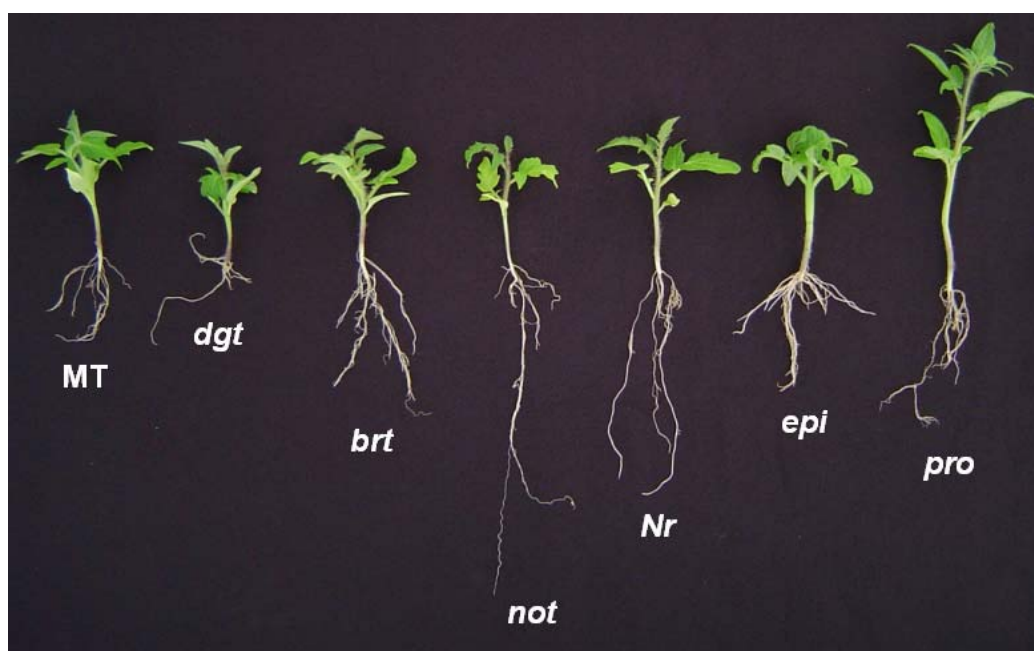


Figura 5 – Fenótipo das raízes de genótipos de tomateiro Micro-Tom (MT), *diageotropica* (*dgt*), *bushy root*, (*brt*), *notabilis* (*not*), *Never ripe* (*Nr*), *epinastic* (*epi*) e *procera* (*pro*), em plântulas de 15 dias. Foto cortesia de Rogério F. Carvalho

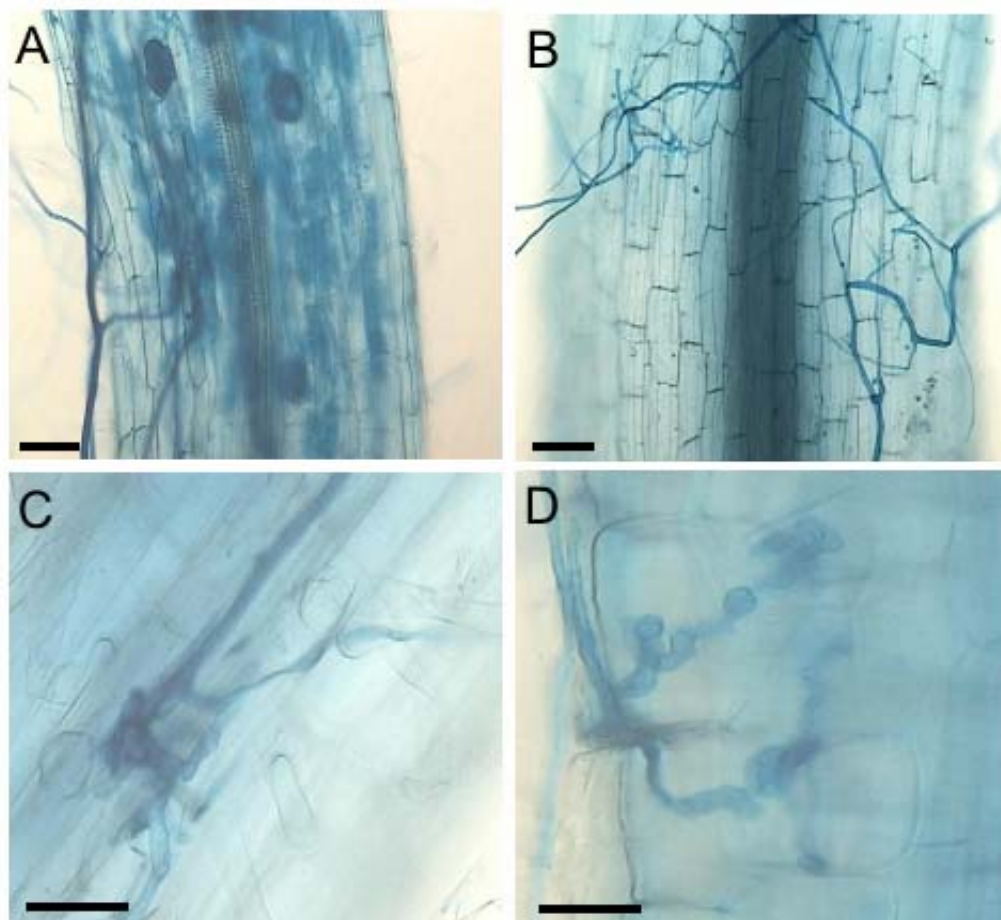


Figura 6 – Alterações morfológicas em raízes de genótipos de tomateiro inoculado com *Glomus clarum*. (A) Micro-Tom, mostrando colonização externa e interna normal por *Glomus clarum*. Barra = 500  $\mu\text{m}$ ; (B) Mutante *epinastic* (*epi*), com abundante colonização externa, mas sem apresentar pontos de penetração. Barra = 500  $\mu\text{m}$  (C) Apressório complexo formado por *G. clarum* em *epi*. Barra = 25  $\mu\text{m}$ ; (D) Desenvolvimento anormal de hifas subepidérmicas em *epi*. Barra = 25  $\mu\text{m}$

### 2.3.3 Análises de biomassa

O acúmulo de matéria seca foi avaliado nos genótipos que apresentaram diferenças significativas no nível de colonização micorrízica (Tabelas 3 e 4). Conforme o esperado (SMITH; READ, 1997), nas condições do primeiro ensaio, o controle Micro-Tom apresentou uma considerável diminuição no valor de biomassa das raízes, decorrente da inoculação com *G. clarum*, em ambas as condições de P analisadas (Tabela 3). Já no mutante *epinastic*, não foi observado este efeito, mas houve um aumento na massa seca da raiz nos tratamentos inoculados com *G. clarum*, apesar que no tratamento com PA, o incremento na massa aérea fez com que, proporcionalmente, a massa da raiz fosse menor (Tabela 3).

Tabela 3 – Experimento 1. Massa seca (MS) da parte aérea e da raiz do material inoculado com o fungo micorrízico *Glomus clarum* (Gc) e não inoculado (n.i.) em condições de P suficiente (P Alto) e deficiência de P (P Baixo). Média ± erro padrão

Genótipo	P	Tratamento	MS parte aérea	MS raiz
MT	Alto	Gc	0,39 ± 0,04	0,125 ± 0,045 a
		n.i.	0,31 ± 0,04	0,217 ± 0,056 b
	Baixo	Gc	0,26 ± 0,02	0,061 ± 0,010 c
		n.i.	0,25 ± 0,02	0,115 ± 0,005 d
<i>epinastic</i>	Alto	Gc	0,56 ± 0,09	0,213 ± 0,009
		n.i.	0,42 ± 0,08	0,190 ± 0,033
	Baixo	Gc	0,25 ± 0,02	0,085 ± 0,007
		n.i.	0,25 ± 0,06	0,065 ± 0,006

Valores acompanhados de letras diferentes (na mesma coluna e para o mesmo genótipo e nível de P) diferem significativamente entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

No segundo experimento, as variações mais significativas foram observadas na parte aérea das plantas e na condição de PB. O controle Micro-Tom apresentou um incremento considerável na biomassa quando inoculado com *G. clarum* em PB, assim como os mutantes *Never ripe*, *diageotropica* e *bushy root* (Tabela 4). Este último genótipo também apresentou o mesmo efeito para massa seca da raiz, enquanto que a colonização micorrízica provocou um decréscimo importante na biomassa da parte aérea de *diageotropica* em PA. Uma outra tendência interessante, já relatada na literatura (SMITH; READ, 1997) foi a diminuição da massa seca da parte aérea nos tratamentos inoculados com *G. clarum* em PA. Neste caso, as diferenças não foram significativas estatisticamente ( $P < 0,05$ ), mas os valores sugerem que as doses de P aplicadas no substrato realmente representam condições de suficiência (PA) e deficiência (PB) de P.

Tabela 4 – Experimento 3. Massa seca (MS) da parte aérea e da raiz do material inoculado com o fungo micorrízico *Glomus clarum* (Gc) e não inoculado (n.i.) em condições de P suficiente (P Alto) e deficiência de P (P Baixo). Média ± erro padrão

Genótipo	P	Tratamento	MS parte aérea	MS raiz
Micro-Tom	Alto	Gc	0,30 ± 0,03	0,077 ± 0,002
		n.i.	0,37 ± 0,07	0,073 ± 0,017
	Baixo	Gc	0,24 ± 0,01 a	0,054 ± 0,003
		n.i.	0,09 ± 0,02 b	0,041 ± 0,000
<i>Never ripe</i>	Alto	Gc	0,32 ± 0,03	0,064 ± 0,004
		n.i.	0,35 ± 0,05	0,056 ± 0,005
	Baixo	Gc	0,23 ± 0,02 c	0,044 ± 0,004
		n.i.	0,06 ± 0,01 d	0,024 ± 0,003
<i>diageotropica</i>	Alto	Gc	0,29 ± 0,03	0,037 ± 0,002 i
		n.i.	0,32 ± 0,03	0,051 ± 0,005 j
	Baixo	Gc	0,29 ± 0,01 e	0,042 ± 0,003
		n.i.	0,08 ± 0,01 f	0,037 ± 0,005
<i>bushy root</i>	Alto	Gc	0,21 ± 0,00	0,029 ± 0,004
		n.i.	0,24 ± 0,01	0,037 ± 0,008
	Baixo	Gc	0,17 ± 0,01 g	0,023 ± 0,003 k
		n.i.	0,03 ± 0,00 h	0,007 ± 0,000 l

Valores acompanhados de letras diferentes (na mesma coluna e para o mesmo genótipo e nível de P) diferem significativamente entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

### 2.3.4 Análises de expressão gênica

Como os resultados anteriores indicaram um claro envolvimento do etileno no nível de colonização pelo fungo, decidiu-se avaliar a expressão gênica das enzimas quitinase e endoglucanase, as quais estão envolvidas na degradação de parede celular (GRAHAM; STICKLEN, 1994; DOMINGO; CONEJERO; VERA, 1994) e cuja atividade pode ser regulada por etileno (OHME-TAKAGI; SUZUKI; SHINSHI, 2000). Para tal, o acúmulo de transcritos em 4 genes diferentes relacionados às referidas enzimas, foi verificado nos mutantes *epinastic* e *Never ripe*, para o tratamento de PB, inoculado por *G. clarum*, por meio da técnica de PCR Real-Time. Observou-se um aumento considerável na expressão do gene *chi9*, codificante para uma quitinase do tipo básico, tanto no caso de *epinastic*, quanto de *Never ripe* (Figura 7A, D). A amplificação do gene para quitinase ácida não foi possível por algum problema não identificado, possivelmente no desenho dos primers. Os genes para  $\beta$ -1,3-glucanases mostraram uma tendência à expressão aumentada em ambos mutantes, com a exceção de *TomPR-Q'a* no caso de *epinastic* (Figura 7B).

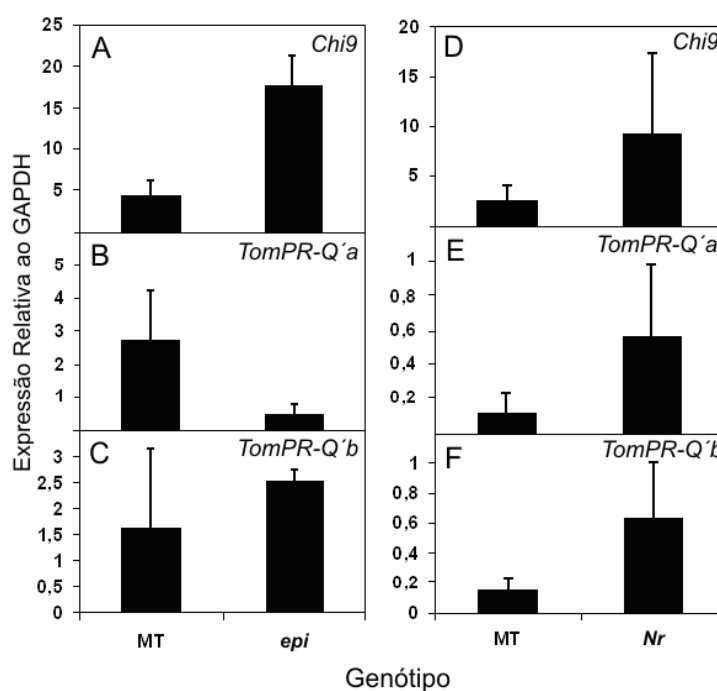
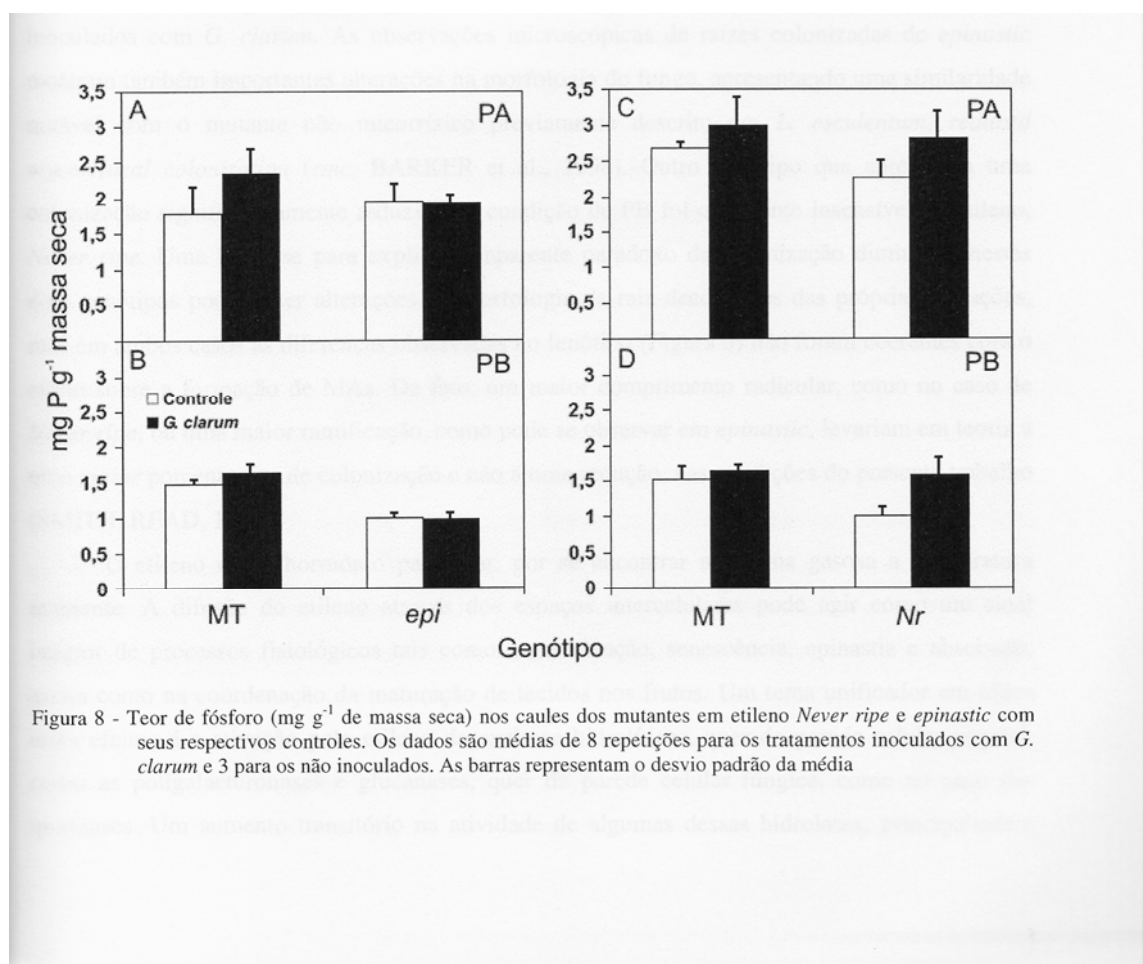


Figura 7 – Expressão gênica relativa em quitinase básica (*chi9*) e  $\beta$ -1,3-glucanases ácida (*TomPR-Q'a*) e básica (*TomPR-Q'b*) nos genótipos Micro-Tom (MT), *epinastic* (*epi*) e *Never ripe* (*Nr*). Todos os ensaios correspondem à condição de deficiência de P, inoculado com *Glomus clarum*. O valor tomado como base foi a expressão do gene *GAPDH*. Os dados são médias de 3 repetições para cada uma de 3 plantas diferentes. As barras representam o desvio padrão da média

### 2.3.5 Dosagem de nutrientes

Para se avaliar o impacto das mutações em etileno no acúmulo de nutrientes de modo direto, ou indiretamente através de seu efeito na colonização, foram realizadas dosagens nos caules de *Never ripe*, *epinastic* e o controle Micro-Tom cujas raízes foram inoculadas ou não inoculadas com *G. clarum*. O teor de P não diferiu entre genótipos, exceto no caso de *epinastic* inoculado com *G. clarum* em deficiência de P, que apresentou um conteúdo de P significativamente menor ao tratamento equivalente em Micro-Tom. Neste caso o baixo teor de P nas plantas mutantes reforça os dados de baixa colonização micorrízica, mostrando que a absorção de P pelo mutante foi significativamente menor que a do Micro-Tom (Figura 8). É também significativo que o teor de P em *epinastic* na condição de PB, foi similar tanto no tratamento não inoculado quanto no inoculado com *G. clarum*. Os valores de teor de outros nutrientes avaliados neste trabalho se encontram tabulados nos Apêndices D-I.



### 2.4 Discussão



## 2.4 Discussão

A série de experimentos aqui relatada é a primeira do seu tipo, pois na literatura existente não se encontram trabalhos onde se tenha avaliado a colonização micorrízica arbuscular em mutantes hormonais de qualquer espécie. As cinco classes de hormônios clássicos foram testadas e os resultados mostram que o etileno parece ter um papel crucial no desenvolvimento da simbiose. A porcentagem de colonização micorrízica interna foi drasticamente diminuída no mutante superprodutor de etileno *epinastic*. Além disso, outra resposta característica de plantas altamente colonizadas em condições de deficiência de P, que é a diminuição da proporção de biomassa alocada para a raiz, não foi observada para *epinastic*, mas sim para o controle Micro-Tom. Uma outra observação interessante foi que, enquanto que na condição de PA o mutante e o controle apresentaram teores de P similares, em deficiência de P os valores foram menores para o mutante, sendo que diferença mais significativa se deu quando ambos genótipos foram inoculados com *G. clarum*. As observações microscópicas de raízes colonizadas de *epinastic* mostram também importantes alterações na morfologia do fungo, apresentando uma similaridade notável com o mutante não micorrízico previamente descrito em *L. esculentum*, *reduced mycorrhizal colonization (rmc*, BARKER et al., 1998). Outro genótipo que apresentou uma colonização significativamente reduzida na condição de PB foi o mutante insensível ao etileno, *Never ripe*. Uma hipótese para explicar o aparente paradoxo da colonização diminuída nestes dois genótipos poderia ser alterações na morfologia da raiz decorrentes das próprias mutações, mas em ambos casos as diferenças observadas no fenótipo (Figura 5) não foram coerentes com o efeito sobre a formação de MAs. De fato, um maior comprimento radicular, como no caso de *Never ripe*, ou uma maior ramificação, como pode se observar em *epinastic*, levariam em teoria a uma maior porcentagem de colonização e não a uma redução, nas condições do presente trabalho (SMITH; READ, 1997).

O etileno é um hormônio particular, por se encontrar na forma gasosa a temperatura ambiente. A difusão do etileno através dos espaços intercelulares 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. Um tema unificador em todos estes efeitos é a ativação pelo etileno de enzimas hidrolíticas, quer da parede celular vegetal, como as poligalacturonases e glucanases, quer da parede celular fúngica, como no caso das quitinases. Um aumento transitório na atividade de algumas dessas hidrolases, principalmente

quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases foi relatado para raízes micorrizadas (LAMBAIS; MEHDY, 1993; SPANU et al., 1989; VIERHEILIG et al., 1994).

Um modelo foi proposto por Lambais e Mehdy (1995) sugerindo que as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases tivessem um papel preponderante na regulação da colonização micorrízica nas raízes, principalmente em relação ao nível de P no substrato. Sucintamente, eles sugerem a existência de isoformas particulares de  $\beta$ -1,3-glucanase que contribuiriam à colonização da raiz, através da hidrólise parcial da parede celular vegetal, facilitando a penetração do fungo. Simultaneamente, existiriam quitinases altamente reguladas pelo nível de P no solo controlando negativamente o grau de colonização pelo fungo, por meio da degradação controlada da parede celular fúngica. Diante disso, foi resolvido testar se essa hipótese poderia explicar a diminuição na colonização dos mutantes *Never ripe* e *epinastic*, avaliando-se neles o acúmulo de mRNAs para isoformas específicas de  $\beta$ -1,3-glucanases e endoquitinases de *L. esculentum* (DOMINGO; CONEJERO; VERA, 1994; DANHASH et al., 1993). De acordo com o modelo, o alto conteúdo de etileno em *epinastic* levaria a uma ativação exagerada das quitinases, impedindo a colonização micorrízica e compensando negativamente pelo efeito positivo do etileno sobre as  $\beta$ -1,3-glucanases. Já no mutante insensível *Never ripe*, a diminuição na sensibilidade ao etileno poderia produzir uma falta de ativação de quitinases, mas também nas  $\beta$ -1,3-glucanases, dando como resultado a baixa colonização observada previamente.

A expressão de quitinase classe I foi consideravelmente aumentada, como era esperado em *epinastic* (BARRY et al., 2001), mas surpreendentemente também em *Never ripe*. As enzimas dentro dessa categoria são básicas, possuem uma alta atividade específica e se encontram localizadas no vacúolo, se bem algumas podem aparecer também extracelularmente (GRAHAM; STICKLEN, 1994). As quitinases classe I respondem pela maior parte da atividade quitinolítica em material vegetal no qual se encontram isoformas ácidas e básicas simultaneamente (LEGRAND et al., 1987; VAN BUREN et al., 1992). Já foi demonstrado que a colonização micorrízica e o nível reduzido de P induzem uma supressão na expressão do gene *NTCHN50*, codificante para uma quitinase básica em *N. tabacum* (DAVID et al., 1998). Porém, uma relação causal ainda não foi provada para o fenômeno de supressão, pois a quitinase básica se localiza no vacúolo, portanto nunca entra em contato com qualquer estrutura do fungo, devido à proteção da membrana periarbuscular (SPANU et al., 1989). Além disso, plantas transgênicas com expressão constitutiva de quitinase básica são colonizadas normalmente (VIERHEILIG et al.,

1995). É, portanto, difícil tirar uma conclusão a partir destes dados, e, no caso particular do mutante *Never ripe*, não existe na literatura nenhuma informação disponível sobre expressão gênica ou atividade de enzimas hidrolíticas para explicar estes resultados.

As análises de  $\beta$ -1,3-glucanases apresentaram resultados igualmente não conclusivos. Os níveis reduzidos de glucanase ácida para *epinastic* e aumentados, em comparação ao controle, para ambas isoformas em *Never ripe*, sugerem pouca correlação com o nível de colonização micorrízica de cada fenótipo. Esse resultado não permite descartar o envolvimento destas enzimas no processo de desenvolvimento da simbiose, pois já foi demonstrado que elas possuem uma indução localizada ao redor de células contendo arbúsculos (LAMBAIS; MEHDY, 1998). A baixa colonização no mutante *Never ripe* também é coerente com a observação de Ishii et al. (1996), que relataram que a aplicação de uma baixa concentração de etileno (0,05  $\mu$ L) estimulou a germinação dos esporos e o crescimento das hifas de *Gigaspora ramisporophora* (ISHII et al., 1996). Isto sugere que além do conhecido efeito inibitório em altas doses, o etileno teria uma função estimulatória no desenvolvimento da simbiose.

Outro aspecto interessante dos dados aqui apresentados é a confirmação do envolvimento dos hormônios auxina e citocinina no processo de colonização micorrízica. Em ambos casos o efeito foi observado na condição de P suficiente, com aumentos consideráveis (se bem que não significativos em  $P < 0,05$ ) na porcentagem de colonização. Isto poderia ser interpretado como uma menor inibição do desenvolvimento do fungo nestes genótipos. Existe evidência de um papel para a citocinina na repressão das respostas à deficiência de P (FRANCO-ZORRILLA et al., 2002; MARTÍN et al., 2000). Foi observado também que a aplicação exógena de auxina e citocinina suprime a expressão de genes induzidos por deficiência de P em *Arabidopsis*, incluindo um transportador de P (KARTHIKEYAN et al., 2002). À luz destes dados, uma hipótese interessante seria a de que a falta de sensibilidade a auxina ou a citocinina faz com que a planta, em uma condição de P suficiente no substrato, deixe de reprimir as respostas de deficiência, comportando-se como se estivesse em uma condição de P insuficiente.

Contudo, pode se dizer que de todas as classes hormonais, o etileno foi a mais importante. Se bem a princípio seria difícil comparar o efeito observado entre os diferentes mutantes, dada a variação de severidade de cada uma das mutações, o fato de dois mutantes para a mesma classe hormonal, e fenotípicamente opostos, terem mostrado as alterações mais significativas, sugere uma coerência interna difícil de ser refutada. Trabalhos futuros estudando a expressão gênica

destes mutantes na presença de um fungo micorrízico e com diferentes níveis de P no substrato, poderão seguramente aportar nova luz acerca do papel do etileno na regulação do desenvolvimento de MAs.

### 3 CONCLUSÕES

- A cultivar Micro-Tom de *L. esculentum* resultou ser um material muito conveniente como modelo para o estudo do processo de formação de MAs.
- Dentre todos os genótipos avaliados neste trabalho, dois deles, *Never ripe* (insensível ao etileno) e *epinastic* (superprodutor de etileno), apresentaram as alterações mais significativas no desenvolvimento de MAs.
- Os parâmetros porcentagem de colonização, biomassa, teor de P e observações morfológicas nas raízes colonizadas, sugerem que o mutante *epinastic* apresenta um comportamento equivalente ao de um mutante não formador de MAs.
- Os padrões de expressão gênica em um conjunto de proteínas de defesa não foram suficientes para explicar o comportamento observado nos mutantes *epinastic* e *Never ripe*.
- Futuros estudos de expressão gênica poderão contribuir para a elucidação do papel do etileno no desenvolvimento da simbiose.

## REFERÊNCIAS

ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E. **Ethylene in plant biology**. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press, 1992. 654p.

ALLEN, M.F.; MOORE Junior., T.S.; CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 58, p.371-374, 1980.

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

AZCÓN-AGUILAR C, BAREA JM. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens—an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, Berlin/Heidelberg, v.6, p.457-464, 1996.

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

BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.810-813, 1982.

BARKER, S.J.; TAGU, D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.19, p.144-154, 2000.

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 characterisation. **Plant Journal**, Oxford, v.15, 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.

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

BLACKMAN, P.G., DAVIES, W.J. Root to shoot communication in maize plants and the effects of soil drying. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.36, p.39-48, 1985.

BLEE, KA.; ANDERSON, A.J. Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. **Plant Journal**, Oxford, v.16, p.523-530, 1998.

- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.) **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 5-33.
- 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 Interactions**, St. Paul, v.13, p.693-698, 2000.
- 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, p.427-431, 1999.
- BRUNDRETT, M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist** Lancaster, v.154, p.275-304, 2002.
- 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**, Lancaster, v.156, p.265-273, 2003.
- CLAPPERTON, M.J.; KOSHIOKA, M.; PHARIS, R.P. The effect of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on the gibberellin content of slender wheat grass. **Plant Physiology**, Rockville, v.77, p.9-82, 1985.
- DANHASH, N.; WAGEMAKERS, C.A.M.; VAN KAN, J.A.L.; DE WIT, P.J.G.M. Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.22, p.1017-1029, 1993.
- DANNEBERG, G.; LATUS, C.; ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDER-POETSCH, H.; BOTHE, H. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balance in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.141, p.33-39, 1992.
- DAVID, R.; ITZHAKI, H.; GINZBERG, I.; GAFNI, Y.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Suppression of tobacco basic chitinase gene expression in response to colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.11, p.489-497, 1998.
- DAVID-SCHWARTZ, D.; BADANI, H.; SMADAR, W.; LEVY, A.A.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra-radical hyphae. **Plant Journal**, Oxford, v.27, p.561-569, 2001.
- DAVIES, P.J. **Plant Hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 427p.
- DIXON, R.K. Cytokinin activity in Citrus jambhiri seedlings colonized by mycorrhizal fungi. **Agricultural Ecosystems and Environment**, Springfield, v.29, p.103-106, 1989.

- DIXON, R.K.; GARRETT, H.E.; COX, G.S. Nutrition and growth of birch seedlings at varied relative phosphorus addition rates. **Tree Physiology**, Hohenheim, v.4, p.9-18, 1988.
- DOMINGO, C.; CONEJERO, V.; VERA, P. Genes encoding acidic and basic class III -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.24, p.725-732, 1994.
- DOUDS, D.D.; JOHNSON, J.R.; KOCH, K.E. Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.86, p.491-496, 1988.
- DRÜGE, U.; SCHÖNBECK, F. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.141, p.40-48, 1992.
- DUGASSA, G.D.; VON ALTEN, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. **Plant Soil**, Dordrecht, v.185, p.173-182, 1996.
- EDRISS, M.H.; DAVIS, R.M.; BURGER, D.W. Influence of mycorrhizal fungi on cytokinin production in sour orange. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Baltimore, v.109, p.587-590, 1984.
- ESCH, H.; HUNDESHAGEN, B.; SCHNEIDER-POETSCH, H.; BOTHE, H. Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Plant Science**, Clare, v.99, p.9-16, 1994.
- FILION, M.; ST-ARNAUD, M.; FORTIN, J.A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms **New Phytologist**, Lancaster, v.141, p.525-533, 1999.
- FITTER, A.H.; MOYERSON, B. Evolutionary trends in root-microbe symbioses. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B**, London, v.351, p.1367-1375, 1996.
- FITZE, D.; WIEPNING, A.; KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.162, p.1210-1219, 2005.
- FRANCO-ZORRILLA, J.M.; MARTIN, A.C.; SOLANO, R.; RUBIO, V.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v.32, p.353-60, 2002.
- FRANKENBERGER, W.T.; ARSHAD, M. **Phytohormones in soils**. New York: Marcel Dekker, 1995. 502 p.



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

GANGE, A.C. Species-specific responses of a root- and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. **New Phytologist**, Lancaster, v.150, p.611-618, 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**, Berlin/Heidelberg, v.11, p.137-143, 2001.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1871-1883, 1996.

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

GRAHAM, J.H. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. chap. 6, p. 127-140.

GRAHAM, L.S.; STICKLEN, M.B. Plant chitinases. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.72, p.1057-1083, 1994.

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 in these two symbioses. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.80, p.695-720, 2002.

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

HARRISON, M.J.; VAN BUUREN, M. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, London, v.378, p.626-629, 1995.

HARRISON, M.J.; DEWBRE, G.R.; LIU, J. A phosphate transporter from *medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Cell**, Rockville, v.14, p.2413-2429, 2002.

HASS, H.; TAYLOR, T.N.; REMY, W. Fungi from the Lower Devonian Rhynie Chert: mycoparasitism. **American Journal of Botany**, Washington, v.81, p.29-37, 1994.

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

- 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 of Horticultural Science**, Osaka, v.65, p.525-592, 1996.
- JONES, M.G. Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. **Planta**, New York, v.172, p.280-284, 1987.
- KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, København, v.109, p.58-67, 2000.
- KELLY, M.O.; BRADFORD, K.J. Insensitivity of the *diageotropica* tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, Rockville, v.82, p.713-717, 1986.
- KARTHIKEYAN, A.S.; VARADARAJAN, D.K.; MUKATIRA, U.T.; D'URZO, M.P.; DAMSZ, B.; RAGHOTHAMA, K.G. Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. **Plant Physiology**, Rockville, v.130, p.221-233, 2002.
- 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, p.952-962, 2003.
- LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defence-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. chap. 3, p. 46-60.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase,  $\beta$ -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, 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 (Suppl. 1), p.S533-S540, 1995.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Spatial distribution of chitinases and  $\beta$ -1-3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. **New Phytologist**, v.140, p.33-42, 1998.
- LEGRAND, M.; KAUFFMANN, S. GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.84, p.6750-6754, 1987.
- LIMA, J. E.; CARVALHO, R. F.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Clare, v.167, p.753-757, 2004.

LIU, J.; 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, p.2106–2123, 2003.

MacARTHUR, 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.

MARTIN, A.C.; DEL POZO, J.C.; IGLESIAS, J.; RUBIO, V.; SOLANO, R.; DE LA PENA, A.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in Arabidopsis. **Plant Journal**, Oxford, v.24, p.559-67, 2000.

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**, København, v.119, p.526-533, 2003.

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**, Oxford, v.12, p.1465-1472, 1997.

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

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

OHME-TAKAGI, M.; SUZUKI, K.; SHINSHI, H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.41, p.1187–1192, 2000.

PARNISKE, M. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, Berlin, v.7, p.414-421, 2004.

PEAT, H.J.; FITTER, A.H. The distribution of arbuscular mycorrhiza in the British flora. **New Phytologist**, Lancaster, v.125, p.845-854, 1993.

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

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**, Lancaster, v.55, p.1743-1750, 2004.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, New York, v.216, p.23-37, 2002.

- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, London, v.414, p.462–466, 2001.
- RAVEN, J.A.; EDWARDS, D. Roots: evolutionary origin and biogeochemical significance. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.52, p.381-401, 2001.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, New York, v.289, p.1920-1921, 2000a.
- REDECKER, D.; MORTON, J.B.; BRUNS, T.D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Antonio, v.14, p.276-284, 2000b.
- 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 USA**, Washington, v.91, p.11841-11843, 1994.
- RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Stanford, v.22, p.281-300, 1988.
- RUIZ-LOZANO, J.M.; COLLADOS, C.; BAREA, J.M.; AZCON, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, Lancaster, v.151, p.493-502, 2001.
- ROSEWARNE, G.; BARKER, S.; SMITH, S.; SMITH, F.; SCHACHTMAN, D. A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorous uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, Lancaster, v.144, p.507-516, 1999.
- SCHACHAR-HILL, Y.; PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.; OSMAN, S.F.; DONER, L.W.; RATCLIFFE, R.G. Partitioning of intermediate carbon metabolism in vesicular–arbuscular leek. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, p.2979-2995, 1995.
- SHAUL-KEINAN, O.; GADKAR, V.; GINZBERG, I.; GRÜNZWEIG, J.; CHET, I.; ELAD, Y.; WININGER, S.; BELAUSOV, E.; ESHED, Y.; ARTZMON, N.; BEN-TAL, Y.; KAPULNIK, Y. Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular colonization with *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, Lancaster, v.154, p.501-507, 2002.
- SCHÜSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v.105, p.1413-1421, 2001.
- SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; TINKER, P.B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, Lancaster, v.117, p.387-398, 1991.
- SIMON, L.; LEVESQUE, R.C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, London, v.363, p.67-69, 1993.

- SMITH, S.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis** 2nd ed. London: Academic Press, 1997. 456p.
- SOLAIMAN, M.D.; SAITO, M. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. **New Phytologist**, Lancaster, v.136, p.533-538, 1997.
- SOLAIMAN, Z.M.; SENOO, K.; KAWAGUCHI, M.; IMAZUMI-ANRAKU, H.; AKAO, S.; TANAKA, A.; OBATA, H. Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus sp.* on roots of hypernodulating mutants of *Lotus japonicus*. **Japanese Plant Research**, Tokyo, v.113, p.443-448, 2000.
- SOMERVILLE, C.R.; MEYEROWITZ, E.M. (Ed.). **The Arabidopsis Book**. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002. 320p.
- SPANU, P.; BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. **New Phytologist**, Lancaster, v.109, p.119-124, 1988.
- 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.
- TAL, M. Abnormal stomatal behavior in wilted mutants of tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.41, p.1387-1391, 1966.
- TANKSLEY, S.D.; GANAL, M.W.; PRINCE, J.P.; VICENTE, M.C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T.M.; GIOVANNONI, J.J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G.B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J.C.; MILLER, L.; PATERSON, A.H.; PINEDA, O.; RÖDER, M.S.; WING, R.A.; WU, M.; YOUNG, N.D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, New York, v.132, p.1141-1160, 1992.
- TAYLOR, I.B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A.J. Control of abscisic acid synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.51, p.1563-1574, 2000.
- TINKER, P.B.; DURALL, D.M.; JONES, M.D. Carbon use in mycorrhizas: theory and sample calculations. **New Phytologist**, Lancaster, v.128, p.115-122, 1994.
- TORELLI, A.; TROTTA, A.; ACERBI, L.; ARCIDIACONO, G.; BERTA, G.; BRANCA, C. IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.) as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. **Plant Soil**, Dordrecht, v.226, p.29-35, 2000.
- VAN BUREN, M.; NEUHAUS, J.M.; SHINSHI, H.; RYALS, J.; MEINS, F. The structure and regulation of homeologous tobacco endochitinase genes of *Nicotiana glauca* and *N. glauca* origin. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.232, p.460-469, 1992.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; LANGE, J.; GUT-RELLA, M.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus moseae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3031–3034, 1995.

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 fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.143, p.337-343, 1994.

VINCENT, J.M. **A manual for practical study of root nodule bacteria**. London: Blackwell Scientific Publishers, 1970. 164p.

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**, New York, v.270, p.1807-1809, 1995.

WU, L-L.; MITCHELL, J.P.; COHEN, N.S.; KAUFMAN, P.B. Gibberellin (GA<sub>3</sub>) enhances cell wall invertase activity and mRNA levels in elongating dwarf pea (*Pisum sativum*) shoots. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v.154, p.280-289, 1993.

# APÊNDICES

Apêndice A – Experimento 1. Porcentagem de colonização do material inoculado com o fungo micorrízico *Glomus clarum* (Gc) em condições de P suficiente (PA) e deficiência de P (PB). Média  $\pm$  erro padrão

<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Colonização</b>
Micro-Tom	PA	22,31 $\pm$ 4,13
	PB	45,95 $\pm$ 4,38 a
<i>epinastic</i>	PA	10,61 $\pm$ 3,93
	PB	14,84 $\pm$ 3,07 b

Valores do mesmo tratamento acompanhados de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

Apêndice B – Experimento 2. Porcentagem de colonização do material inoculado com o fungo micorrízico *Glomus clarum* (Gc) em condições de P suficiente (PA) e deficiência de P (PB). Média  $\pm$  erro padrão

<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Colonização</b>
Micro-Tom	PA	43,47 $\pm$ 7,06
	PB	74,84 $\pm$ 4,77
<i>notabilis</i>	PA	37,12 $\pm$ 3,47
	PB	74,81 $\pm$ 7,49

Valores no mesmo tratamento acompanhados de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).



Apêndice C – Experimento 3. Porcentagem de colonização do material inoculado com o fungo micorrízico *Glomus clarum* (Gc) em condições de P suficiente (PA) e deficiência de P (PB). Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Colonização
Micro-Tom	PA	45,57 $\pm$ 4,80
	PB	84,66 $\pm$ 3,73 a
<i>Never ripe</i>	PA	33,14 $\pm$ 4,05
	PB	67,18 $\pm$ 6,08 b
<i>procera</i>	PA	58,43 $\pm$ 4,34
	PB	84,20 $\pm$ 1,99
<i>diageotropica</i>	PA	60,58 $\pm$ 3,94
	PB	87,23 $\pm$ 2,09
<i>bushy root</i>	PA	60,58 $\pm$ 3,94
	PB	87,23 $\pm$ 2,09

Valores no mesmo tratamento acompanhados de letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

Apêndice D – Teor de cálcio ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Não inoculado	Inoculado com <i>G. clarum</i>
Micro-Tom	PA	11,84 $\pm$ 1,97	10,12 $\pm$ 1,10
	PB	9,45 $\pm$ 3,45	10,99 $\pm$ 1,28
<i>epinastic</i>	PA	10,58 $\pm$ 1,10	13,70 $\pm$ 2,31
	PB	12,05 $\pm$ 3,25	15,74 $\pm$ 2,40
Micro-Tom	PA	6,10 $\pm$ 0,96	6,42 $\pm$ 0,14
	PB	6,76 $\pm$ 2,28	6,33 $\pm$ 0,43
<i>Never ripe</i>	PA	5,50 $\pm$ 0,64	5,54 $\pm$ ,036
	PB	8,16 $\pm$ 0,64	5,51 $\pm$ 0,62

Apêndice E – Teor de magnésio ( $\text{g Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Não inoculado	Inoculado com <i>G. clarum</i>
Micro-Tom	PA	4,81 $\pm$ 0,85	4,39 $\pm$ 0,54
	PB	5,52 $\pm$ 1,28	5,39 $\pm$ 0,70
<i>epinastic</i>	PA	4,14 $\pm$ 0,25	6,75 $\pm$ 1,57
	PB	6,19 $\pm$ 2,18	9,12 $\pm$ 1,21
Micro-Tom	PA	6,60 $\pm$ 1,52	6,84 $\pm$ 0,42
	PB	9,84 $\pm$ 3,37	7,51 $\pm$ 0,65
<i>Never ripe</i>	PA	6,32 $\pm$ 1,26	5,87 $\pm$ 0,47
	PB	11,7 $\pm$ 1,65	6,28 $\pm$ 0,75

Apêndice F – Teor de cobre ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Não inoculado	Inoculado com <i>G. clarum</i>
Micro-Tom	PA	6,10 $\pm$ 1,43	4,77 $\pm$ 0,80
	PB	5,50 $\pm$ 1,30	5,83 $\pm$ 0,82
<i>epinastic</i>	PA	4,93 $\pm$ 0,42	6,42 $\pm$ 1,41
	PB	5,46 $\pm$ 2,62	7,31 $\pm$ 0,97
Micro-Tom	PA	7,26 $\pm$ 1,36	11,57 $\pm$ 1,27
	PB	15,60 $\pm$ 4,38	18,08 $\pm$ 1,90
<i>Never ripe</i>	PA	7,40 $\pm$ 1,53	11,97 $\pm$ 1,86
	PB	10,26 $\pm$ 1,19	11,93 $\pm$ 2,43

Apêndice G – Teor de ferro ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Não inoculado	Inoculado com <i>G. clarum</i>
Micro-Tom	PA	382,93 $\pm$ 95,38	257,17 $\pm$ 53,62
	PB	172,93 $\pm$ 56,31	257,60 $\pm$ 32,15
<i>epinastic</i>	PA	332,16 $\pm$ 144,68	338,56 $\pm$ 70,93
	PB	203,30 $\pm$ 37,58	408,01 $\pm$ 45,56
Micro-Tom	PA	193,60 $\pm$ 22,77	463,24 $\pm$ 217,20
	PB	322,40 $\pm$ 38,57	312,97 $\pm$ 69,27
<i>Never ripe</i>	PA	177,56 $\pm$ 38,36	232,25 $\pm$ 23,38
	PB	341,80 $\pm$ 56,22	311,41 $\pm$ 63,10

Apêndice H - Teor de manganês ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

Genótipo	Tratamento	Não inoculado	Inoculado com <i>G. clarum</i>
Micro-Tom	PA	58,26 $\pm$ 8,88	75,31 $\pm$ 11,54
	PB	142,63 $\pm$ 47,91	170,73 $\pm$ 22,40
<i>epinastic</i>	PA	44,73 $\pm$ 8,93	88,36 $\pm$ 15,43
	PB	125,90 $\pm$ 35,43	201,88 $\pm$ 20,56
Micro-Tom	PA	308,46 $\pm$ 66,59	256,64 $\pm$ 29,58
	PB	397,46 $\pm$ 170,14	252,05 $\pm$ 26,77
<i>Never ripe</i>	PA	357,50 $\pm$ 31,66	281,85 $\pm$ 21,18
	PB	650,63 $\pm$ 174,47	325,72 $\pm$ 40,92

Apêndice I – Teor de zinco ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ) dos mutantes em etileno *Never ripe* e *epinastic* com seus respectivos controles. Média  $\pm$  erro padrão

<b>Genótipo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Não inoculado</b>	<b>Inoculado com <i>G. clarum</i></b>
Micro-Tom	PA	31,46 $\pm$ 3,98	31,01 $\pm$ 4,06
	PB	41,36 $\pm$ 10,43	39,73 $\pm$ 4,26
<i>epinastic</i>	PA	32,83 $\pm$ 2,78	37,36 $\pm$ 4,37
	PB	53,63 $\pm$ 21,64	66,75 $\pm$ 8,71
Micro-Tom	PA	37,63 $\pm$ 20,46	41,78 $\pm$ 4,59
	PB	62,67 $\pm$ 21,77	54,57 $\pm$ 4,32
<i>Never ripe</i>	PA	46,56 $\pm$ 10,25	39,58 $\pm$ 4,48
	PB	82,76 $\pm$ 21,14	44,26 $\pm$ 7,55