

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DA MICORRIZAÇÃO E DO FÓSFORO SOBRE
A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM
RAÍZES DE TOMATEIRO**
(Solanum esculentum)

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

Orientador: Professora Doutora Leonor Costa Maia

Co-orientador: Doutor Bartolomeu Acioli dos Santos

RECIFE-PE

2013

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

**INFLUÊNCIA DA MICORRIZAÇÃO E DO FÓSFORO SOBRE A
EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM RAÍZES DE
TOMATEIRO**
(Solanum esculentum)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia.

Orientador: Professora Doutora Leonor Costa Maia

Co-orientador: Doutor Bartolomeu Acioli dos Santos

RECIFE-PE

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Clarissa de França Oliveira

Influência da micorrização e do fósforo sobre a expressão diferencial de genes de defesa em raízes de tomateiro (*Solanum esculentum*) / Clarissa da França Oliveira Silva. – Recife: O Autor, 2013.

52 folhas: il.

Orientadora: Leonor Costa Maia

Coorientador: Bartolomeu Acioli dos Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Micorriza 2. Mutualismo 3. Tomate 4. Fosfato I. Maia, Leonor Costa Maia (orient.) II. Santos, Bartolomeu Acioli dos (coorient.) III. Título.

577.852

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-094

CLARISSA DE FRANÇA OLIVEIRA SILVA

**INFLUÊNCIA DA MICORRIZAÇÃO E DO FÓSFORO SOBRE A EXPRESSÃO
DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM RAÍZES DE TOMATEIRO (*SOLANUM
ESCULENTUM*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia.

Orientador: Professora Doutora Leonor Costa Maia

Co-orientador: Doutor Bartolomeu Acioli dos Santos

Data da Defesa: 26 de Fevereiro de 2013.

Resultado: APROVADA.

Banca Examinadora

TITULARES

Prof. Dra. Leonor Costa Maia (Departamento de Micologia- UFPE)

Prof. Dra. Elaine Malosso (Departamento de Micologia – UFPE)

Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Departamento de Bioquímica – UFPE)

SUPLENTES

Prof. Dr. Bartolomeu Acioli (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Dra Valesca Pandolfi (Departamento de Genética- UFPE)

“Apesar das ruínas e da morte, onde sempre acabou cada ilusão, a força dos meus sonhos é tão forte, que de tudo renasce a exaltação, e nunca as minhas mãos ficam vazias.”

Sophia de Mello Breyner

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida com a qual me abençoou, pelo corpo e mente saudáveis, que me permitem planejar, projetar e construir.

A Prof^a Dr^a Leonor Costa Maia, pela oportunidade, confiança e orientação durante todo período do trabalho de desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores Bartolomeu Acioli e Ederson Akio Kido pelas sugestões, contribuições e ensinamentos.

A professora Márcia Vanusa pelo apoio, humildade e essencialmente pelo incentivo.

Aos meus pais Lucidalva e Luiz, pelo apoio e amor durante todas as etapas da minha vida; e às minhas irmãs com quem dividi todos os momentos dessa jornada que há muito se iniciou.

Aos integrantes dos Laboratórios de Genética Molecular dos Departamentos de Bioquímica e Genética pela colaboração para utilização dos equipamentos e dependências dos laboratórios, mas, sobretudo pela amizade e companheirismo sempre presentes e com os quais compartilho amizades verdadeiras.

Aos integrantes do Laboratório de Micorrizas, do Departamento de Micologia, pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos da Pós-graduação, pela presença constante, em momentos de decisão, de dificuldade e de aprendizado. Pela convivência e por transformarem essa importante etapa de desafios em momentos divertidos e leves.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco, pelo auxílio e colaboração ao longo desta jornada.

À Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa de Pernambuco, FACEPE, pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

As micorrizas arbusculares (MAs) são simbioses mutualistas, formadas entre fungos do Filo Glomeromycota e as raízes da maioria das plantas. Para o hospedeiro vegetal essas associações proporcionam maior disponibilidade de nutrientes minerais e resistência contra patógenos, entre outros benefícios. O tomateiro é uma solanácea herbácea com ampla capacidade adaptativa, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. Essa cultura vem sendo utilizada como modelo vegetal para o estudo da regulação micorrízica, em alternativa à *Arabidopsis thaliana*, pois possui ciclo de vida curto e genoma relativamente pequeno (950Mb), além disso são facilmente micorrizáveis. O estabelecimento das MAs envolve uma série de eventos bioquímicos e moleculares regulados por ambos simbioses, ainda não totalmente esclarecidos. O estudo da expressão gênica em raízes colonizadas permitirá melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da simbiose, contribuindo para melhor aplicabilidade desta. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão diferencial dos genes *Chi3*, *BGL2*, *CAT2* e *APX1*, envolvidos na resposta de defesa do tomateiro em função da colonização com *Glomus etunicatum* e do nível de P no solo, através de RT-qPCR. Plântulas de tomateiro foram transferidas para sacos de polietileno com areia e vermiculita esterilizadas e inoculadas com *G. etunicatum*. O delineamento experimental consistiu de tratamentos com e sem inoculação e solução nutritiva com 3 níveis de fósforo (3, 8 e 15 mg/dm³). As raízes foram coletadas 8, 15 e 30 dias após a inoculação (d.a.i.) para análise do percentual de colonização e expressão gênica. Apesar da presença de estruturas micorrízicas na maioria das amostras, os percentuais de colonização foram menores aos 8 d.a.i. e aumentaram ao longo do tempo de cultivo, atingindo o máximo aos 30 d.a.i. Sabe-se que o teor de P é de grande importância para o estabelecimento das micorrizas, nesse sentido, os maiores valores de colonização foram encontrados nas amostras com baixa concentração de P na solução nutritiva aplicada, enquanto que no tratamento com alto nível de P a colonização foi reduzida ou inibida. Os primers para amplificação dos genes *BGL2*, *CAT2* e *APX1* não foram eficientes nas reações de RT-qPCR e por isso estes genes não puderam ser validados no presente trabalho. Entretanto, os ensaios para o alvo *Chi3* foi eficiente e mostrou-se adequado para o experimento. A análise da expressão gênica mostrou que o gene *Chi3* sofreu influência da concentração de fósforo e tempo de micorrização (T0, T1, T2). Dessa forma, as amostras cultivadas em condições de baixo fósforo, tiveram a expressão da quitinase aumentada na primeira semana de cultivo e reduzida nas semanas seguintes, indicando que durante os primeiros estágios da micorrização pode haver uma indução temporária desse gene de defesa seguido de supressão após o reconhecimento entre os simbioses. Entretanto, apenas na primeira semana a variação de P interferiu no acúmulo de transcritos da quitinase. A análise da expressão de genes que codificam enzimas do sistema defensivo vegetal é necessária para compreensão dos mecanismos do desenvolvimento da micorriza arbuscular. Assim, os dados obtidos neste trabalho fornecerão subsídios para um melhor entendimento do papel de genes de defesa nesta simbiose.

Palavras-chaves: Quitinase; PCR em tempo real; Sinalização; Fosfato.

ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizas (AMs) are mutual symbiosis formed between fungi of the Glomeromycota phylum and the roots of most plants. For the plant host, these associations provide greater mineral nutrient availability and resistance against pathogens, among other benefits. The tomato plant is a highly adaptable solanaceous herb and Brazil is one of the largest worldwide producers. This crop has been used as a plant model for studying mycorrhizal regulation as an alternative to *Arabidopsis thaliana* since tomatoes have a short life cycle and relatively small genome (950 Mb), besides being easily mycorrhizable. Establishing AMs involves a series of biochemical and molecular events regulated by both symbionts which have not been fully understood. The study of the gene expression in colonized roots will allow for better comprehension of the mechanisms involved in the development of symbiosis, thus contributing to its better applicability. The goal of this study was to analyze the differential expression of genes *Chi3*, *BGL2*, *CAT2* and *APX1* – involved in the defense response of tomato plants due to *G. etunicatum* colonization and soil P content – using RT-qPCR. Tomato plantlets were transferred to polyethylene bags with sterilized sand and vermiculite and inoculated with *G. etunicatum*. The trial design included treatments with and without inoculation using nutrient solutions with three levels of phosphorous (3, 8, and 15 mg/dm³). The roots were collected 8, 15, and 30 days after inoculation (d.a.i.) for the analysis of the percentage of colonization and gene expression. Despite the presence of mycorrhizal structures in most plants, the percentages of colonization were lower at 8 d.a.i. and increased over the cultivation time, reaching its highest value at 30 d.a.i. It is known that P content is very important for mycorrhizae establishment. Thus, higher colonization values were found in the samples with low P content in the nutrient solution, while the treatment with high P content had lower or inhibited colonization. The primers for amplifying the genes *BGL2*, *CAT2*, and *APX1* were not efficient in the RT-qPCR reactions, therefore these genes could not be validated in the current study. However, the trials for the target *Chi3* were efficient and showed to be adequate to the experiment. The Analysis of gene expression showed that the gene *Chi3* was influenced by phosphorous concentration and mycorrhization time (T0, T1, T2). Therefore, chitinase expression in the samples grown in low phosphorous (BP) conditions increased in the first week of growth and decreased in the following weeks, which indicates that during the first stages of mycorrhization there may be a temporary induction of this defense gene followed by suppression after recognition between the symbionts. Nevertheless, only in the first week did the variation in P interfere in the accumulation of chitinase transcripts. Analyzing the expression of genes that code enzymes of plants' defensive system is needed to understand the mechanisms of arbuscular mycorrhizal development. Thus, the data obtained in this study will provide insights to better understand the role of defense genes in this symbiosis.

Key-words: Chitinase; Real Time PCR; Signaling; Phosphate

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - *Solanum esculentum*..... **Pág. 3**
- Figura 2** - Origem do tomateiro na região andina da América do Sul (FABBRI, 2009)..... **Pág. 4**
- Figura 3** – Esquema mecanismos de defesa após o reconhecimento entre simbiontes durante a interação micorrízica arbuscular..... **Pág. 10**

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

Figura 1. Arbúsculos (A) e vesículas (B) presentes nas amostras..... **Pág. 30**

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose de fragmento amplificado via PCR pelo primer 18S rRNA com produtos de transcrição reversa de amostras de raízes de tomateiro T0/BP (1), T0/AP (2), T1/BP (3), T1/AP (4), T2/BP (5), T2/AP (6) (A). Em B amplificação do gene *Chi3* com cDNA T0. (M) marcador molecular em Kb **Pág. 31**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Colonização vesicular por *Glomus etunicatum* (GE), de raízes de tomateiro, cultivadas com diferentes níveis de P, em função do tempo..... **Pág. 29**

Tabela 2. Análise por RTqPCR do nível da expressão relativa do gene *Chi3* em tomateiro inoculado por *Glomus etunicatum* (GE), cultivado com diferentes níveis de P..... **Pág. 32**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 O tomate- uma breve descrição	14
2.2 Micorrizas Arbusculares: características gerais	16
2.3 O sistema de defesa vegetal.....	19
2.3.1 Proteínas relacionadas à patogênese: quitinase e β -1,3-glucanase	21
2.3.2 Enzimas antioxidantes: peroxidase e catalase	23
2.4 Expressão diferencial de genes em resposta à inoculação com FMA	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo Geral	35
4.2 Objetivos Específicos	35
Capítulo I	
Influência da micorrização e do fósforo sobre a expressão diferencial de genes de defesa em raízes de tomate (<i>Solanum esculentum</i>)	36
5. CONCLUSÃO	46
6. ANEXOS	47
6.1 Reações de cDNA dos alvos APX, CAT, BGL2 e <i>Chi3</i>	47
6.2 Gráficos da obtenção da eficiência dos primers	48
6.3 Tabela de pares de oligonucleotídeos	52

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum esculentum* Mills) é uma solanácea herbácea com ampla capacidade adaptativa, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais (Agrianual, 2008), apresentando cerca de 54.000 hectares cultivados no território nacional. No Agreste Pernambucano foram destinados em 2011, 1.900 hectares de área plantada para os municípios de Gravatá, Bezerros, Sairé, Camocim de São Félix, São Joaquim do Monte Bonito e Caruaru (Manarim, et al, 2011). A cultura do tomate exige um conjunto de medidas de proteção contra o ataque cíclico de patógenos, devido à vulnerabilidade que esta apresenta (Tamiso, 2005). O produtor, mesmo tendo à disposição uma gama de defensivos agrícolas, sempre está suscetível a grandes prejuízos, pois o cultivo deste fruto é vulnerável a problemas fitossanitários, como o ataque de fungos, bactérias, vírus e namatóides, que limitam sua produção (Lopes; Ávila, 2005). Algumas dessas doenças podem ser controladas mediante adequado programa de manejo integrado, que envolve o uso de variedades resistentes e a adoção de medidas de exclusão, erradicação e proteção (Kurozawa; Pavan, 2005). Entretanto, alternativas têm sido apresentadas como aplicação de biocontroladores de doenças e pragas, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Maia et al., 2005).

Micorrizas arbusculares são associações mutualistas entre raízes da maioria das plantas e fungos do filo Glomeromycota. São caracterizadas pelo crescimento intracelular das hifas fúngicas e pela diferenciação de estruturas típicas chamadas arbúsculos no tecido cortical vegetal (Bonfante-Fasolo, 1989). O estabelecimento da micorriza arbuscular envolve uma série de eventos morfológicos e bioquímicos específicos, regulados pelos dois simbioss e afetados por fatores abióticos (Lambais, 2003). Dentre os fatores abióticos está a influência da concentração de P na modulação da expressão de genes de defesa. Os mecanismos envolvidos nessa regulação pelo P ainda não estão esclarecidos, no entanto, essa modulação pode envolver alterações no balanço de fitorreguladores nos tecidos vegetais, como ácido idobutírico (AIB), citocininas, giberelinas (GAs), etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (AJ) e ácido salicílico (AS) os quais podem favorecer a associação simbiótica e incrementar o crescimento da planta (Moreira et al, 2002; Jentschel et al., 2007; Silveira; Freitas, 2007).

Durante a interação planta-patógeno mecanismos de defesa são ativados em consequência da infecção microbiana (Harrison, 1999) podendo envolver respostas de hipersensibilidade (RH) que pode ser acompanhada pelo aumento da concentração de espécies

reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou acúmulo de fitoalexinas. Já na formação de micorrizas a falta da RH após o reconhecimento do FMA indica a não ativação, baixo nível de resposta ou supressão do sistema de defesa da planta, podendo ocorrer acúmulo de fitoalexinas apenas nos estágios mais tardios da simbiose e em concentrações muito inferiores às observadas nas interações com fungos patogênicos (Souza, 2006).

Os principais genes de defesa já estudados na associação micorrízica estão associados à via biossintética de fitoalexinas isoflavonóides (chalcone-sintetase, chalcone-isomerase), à codificação de hidrolases que degradam a parede celular fúngica (quitinases, β-1,3-glucanases) e à codificação de proteínas envolvidas no aumento da rigidez da parede celular vegetal e em processos de oxi-redução (peroxidases, catalalases) (Lambais, 2003). Devido ao possível efeito desses genes sobre o controle da simbiose micorrízica, pesquisas recentes têm se concentrado na análise da sua expressão ao nível de proteína e/ou mRNA. Blilou et al (2000) observaram um acúmulo de transcritos codificando uma peroxidase em raízes de fumo inoculadas com *G. mossae*, induzido pela colonização do fungo durante os primeiros dias após a inoculação. No mesmo sentido, Ruiz-Lozano et al (2001) estudaram a indução de 7 genes relacionados à defesa vegetal, pI206, pI 49, pI176, PR10, ácido transcinâmico 4-hidrolase, chalcona isomerase e uma quitinase básica A1, em raízes de ervilha micorrizadas por *Glomus mossae* e *Glomus intraradices*. Eles observaram que houve um acúmulo desses transcritos durante as primeiras semanas da interação micorrízica, seguido de supressão nas semanas seguintes, indicando que tais genes podem estar relacionados com a formação de estruturas como apressórios e arbúsculos e com o controle da simbiose.

Apesar das análises realizadas ainda são grandes as limitações a respeito dos genes e biomoléculas e suas respectivas funções durante o desenvolvimento da simbiose micorrízica, especialmente para a associação formada com o tomateiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O tomate- uma breve descrição

Solanum esculentum Mill, conhecido popularmente como tomate, é um fruto pertencente à família Solanaceae, a qual representa um dos maiores grupos de angiosperma eudicotiledônea, com diversas plantas de interesse econômico e importância alimentícia. Esta família reúne cerca de 150 gêneros e 3000 espécies de distribuição cosmopolita, sendo *Solanum* o gênero de maior representatividade (Souza; Lorenzzi, 2008). O tomateiro (Fig 1) é uma espécie originária da costa Oeste da América do Sul, sobretudo na Região dos Andes (Fig 2), onde a temperatura e precipitação pluviométrica são moderadas. Segundo Camargo Filho (1997), a ancestralidade andina do tomateiro se deu a partir da espécie *S. esculentum* var. *cerasiforme*, o tomate cereja, que se expandiu por toda América Tropical.

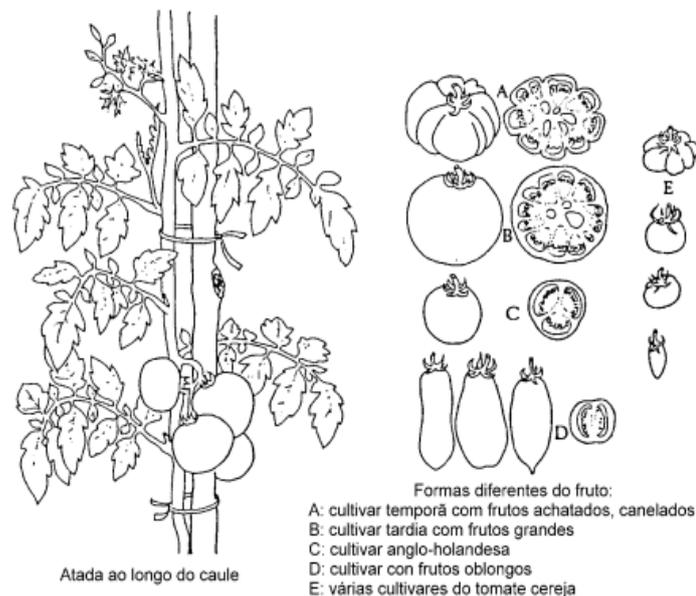


Figura 1: Esquema generalizado dos diferentes cultivares do tomate.
 Disponível em <http://umaquintanacidade.files.wordpress.com/2012/02/a-cultura-do-tomate.pdf>

Apesar de ser encontrado em locais com características climáticas bastante diversas, apresentando distribuição cosmopolita, a temperatura mínima tolerada para germinação de suas

sementes é de 8 a 11 °C e a máxima de 34 °C. Também o excesso de chuvas prejudica o seu ciclo por favorecer o surgimento de doenças (Carvalho; Pagliuca, 2007).

Seu cultivo no continente Europeu se deu por volta do século XVI, mas devido à referência com solanáceas contendo alcaloides tóxicos, seu uso foi restrito à ornamentação, sendo pouco utilizado como alimento (Camargo Filho, 1994). A produção do fruto no Brasil teve início por volta do século XX, com a queda da hegemonia do café e a diversificação agrícola, quando na década de 30 já era possível encontrar seu cultivar mais importante, o Santa Cruz (Camargo Filho, 1997). Entre 1940 e 1987 houve um aumento da participação da olericultura no cenário econômico, sobretudo para batata, tomate e cebola que somaram em 1985 5,7% da produção, ao lado de outras hortaliças e produtos que ao longo das décadas se expandiram no cenário nacional (Carvalho; Pagliuca, 2007).

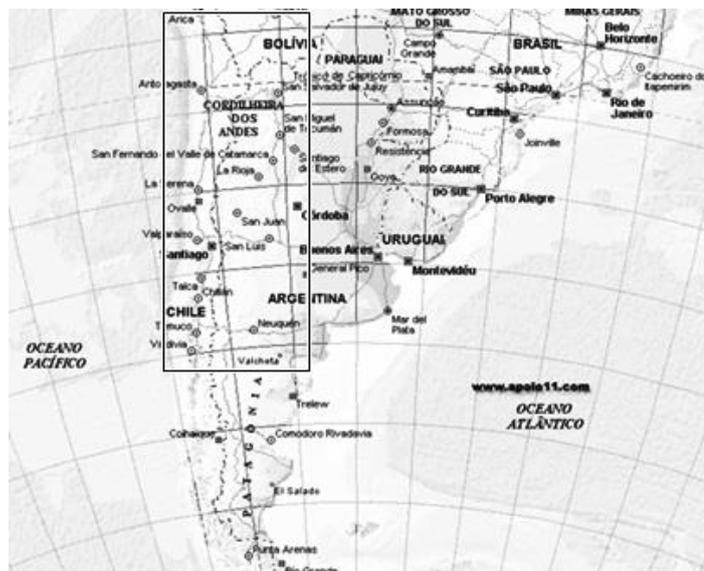


Figura 2: Mapa parcial da América do Sul com destaque para a região que representa o provável local de origem do tomateiro (FABBRI, 2009).

A utilização de variedades melhoradas do tomateiro, mais resistentes e com maior capacidade produtiva auxiliou a demanda mundial nos últimos 20 anos, que duplicou como consequência do aumento do consumo, tanto na forma processada quanto na fresca. Além disso, foram realizados importantes investimentos em áreas de cultivo no continente Asiático e no Africano (Carvalho; Pagliuca, 2007) e de acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2011) a China representa o maior produtor mundial, juntamente com os Estados Unidos e Índia.

Em 2008, o Brasil ocupou a nona posição na produção mundial (FAO/ONU, 2011) e atualmente apresenta um crescimento acima da média mundial. Esse fato está intimamente relacionado com a ampliação de técnicas de irrigação, uso de insumos e de híbridos com características nutricionais diferenciadas para melhora não apenas na produção, mas no consumo (Giordano et al, 2003). Apesar dos avanços já obtidos, ainda há dificuldades na comercialização do tomate *in natura* devido à necessidade de adaptação logística em função da perecibilidade e de barreiras tarifárias e fitossanitárias impostas entre os países, que dificultam a inserção brasileira no mercado internacional (Heine, 2012).

As lavouras de tomateiro tem representatividade em todas as regiões brasileiras, destacando-se a Sudeste com 39% da produção e a Centro- Oeste com 28%, sendo o Estado de Goiás o principal produtor nacional. De acordo com dados do IBGE (2011), o Nordeste apresentou uma pequena redução produtiva de 2010 para 2011, mas manteve sua área plantada, ao contrário das demais regiões.

Nos últimos anos tem sido reconhecida a importância da inserção do tomate na dieta, pela presença de substâncias como as vitaminas A e C e, sobretudo o licopeno, que agregam um alto valor nutricional. O licopeno é um pigmento carotenoide, encontrado principalmente em frutas e vegetais vermelhos. Esta substância possui ligações duplas conjugadas o que lhe confere propriedade antioxidante, reagindo com os radicais livres, suprimindo-os e protegendo o sistema biológico humano, estando por esse motivo associado à diminuição de diversos tipos de cânceres e doenças cardiovasculares (Pereira, et al., 2009). Devido a esse potencial quimiopreventivo e antiaterosclerótico, o licopeno tem sido importante alvo de pesquisas, ao lado de outros carotenoides como fitoeno, fitoflueno, beta-caroteno e flavonoides como a quercetina, que potencializam o efeito antioxidante do fruto (Vitale, et al., 2010). Estudos demonstraram que o percentual de inibição da carcinogênese em tumores de próstata de camundongos foi maior com a utilização do pó do fruto em comparação com o licopeno isolado, o que demonstra o efeito sinérgico dos compostos. Os frutos do tomate podem ser consumidos de forma fresca, em saladas ou processados (Faria, 2005; Heine, 2012; Oliveira et al, 2012).

2.2 Micorrizas arbusculares: Características gerais

As micorrizas arbusculares (MAs) são reconhecidamente a mais antiga relação simbiótica existente entre fungos e plantas. Em 1974, Pirozynski e Malloch sugeriram que os

fungos micorrízicos arbusculares (FMA) colaboraram com as plantas para tornar a terra “mais verde”, auxiliando, assim, na colonização e dominância das mesmas. Esses autores sugeriram que a associação deveria ser de natureza mutualística, que beneficiaria o fungo e a planta, na qual o fungo melhoraria a absorção de minerais e água pela planta e em troca receberia os fotossintatos. Essas propostas foram confirmadas anos depois através de estudos dos registros fósseis, sugerindo que desde os primórdios da ocupação terrestre pelos vegetais, há aproximadamente 400 milhões de anos, existiam fungos com atributos comuns aos atuais FMAs, que diante de uma série de mudanças climáticas e ambientais contribuíram para a evolução e sobrevivência desses vegetais (Redecker et al, 2000).

Os FMAs estão atualmente classificados no Filo Glomeromycota e Classe Glomeromycetes, sendo ainda poucas as espécies descritas, considerando a grande diversidade de plantas com as quais podem associar-se (Souza et al, 2006). Tais comunidades tem aumento de matéria seca e maior extensão radicular através da associação com o FMA, mas nem sempre efeitos benéficos são observados pois os fungos podem estar em pequena quantidade ou não haver reconhecimento entre os simbiossomas (Maia et al., 2005).

Dentre os grupos que não realizam associação com fungos arbusculares, pode-se citar Caryophyllaceae, Proteaceae, Cupressaceae, Polygonaceae, Resedaceae, Urticaceae, Portulacaceae (Takahashi, 2005) e Brassicaceae (Souza, et al., 2007). Ainda que não seja exigida alta especificidade entre os simbiossomas, a grande diversidade de interações mutualistas que ocorre entre fungo e hospedeiro vegetal evidencia a complexidade genética existente e influencia na ciclagem dos nutrientes, produtividade e estabelecimento dos vegetais (Smith, 2002).

Os fungos micorrízicos arbusculares, estão dentre os microrganismos mais abundantes do solo, têm seu crescimento radicular caracterizado por hifas intracelulares e um micélio extraradicular. Esse aparelho externo permite uma maior captação de macronutrientes (P, N) e micronutrientes (Cu, Zn) totais, aumento da estabilidade física radicular, bem como da resistência contra microrganismos patogênicos (Latef, 2011; Smith et al, 2011). Por apresentarem hábito biotrófico obrigatório, seu ciclo de vida torna-se limitado quando cultivado sem que haja colonização de raízes compatíveis. Nesse sentido, para o estabelecimento da simbiose, uma série de eventos é necessária antes mesmo do contato do fungo com a planta hospedeira, como a germinação dos esporos e formação do tubo germinativo, a chamada *fase assimiótica*. Na fase pré-simbiótica ocorre a comunicação entre os simbiossomas, quando moléculas sinalizadoras (fatores de ramificação) são liberadas pela

planta, através do exsudato das raízes e estimulam a formação das hifas fúngicas, que por sua vez se diferenciam em apressórios e, em seguida, na fase simbiótica, hifas colonizadoras do córtex vegetal (Walter, 2009; Sandra, 2012). Dentre os compostos sinalizadores já conhecidos, estão aqueles pertencentes à classe das estrigolactonas como 5-desoxi-estrigol, sorgolactona, estrigol e GR24, capazes de induzir a ramificação hifas de *Gigaspora margarita* mesmo em baixas concentrações (Akiyama, et al 2005).

Durante a fase simbiótica, ocorre a penetração das estruturas através do aumento da pressão na parede celular seguida de degradação por enzimas hidrolíticas produzidas pelos FMAs, como celulasas, pectinases e hemicelulasas (Silveira; Freitas, 2007). A colonização é acompanhada por diversos eventos como alterações na parede celular fúngica, incluindo deposição de material semelhante à parede celular vegetal ao redor da hifa com criação de uma interface de características específicas, aumento da síntese de membrana plasmática e do volume citoplasmático e rearranjo do citoesqueleto. A partir de então, algumas hifas diferenciam-se em arbúsculos, estruturas responsáveis pelas trocas de carboidratos e nutrientes entre simbioses e a parede celular se torna amorfa, como consequência de diversas alterações moleculares. Também ocorrem mudanças metabólicas na planta, que implica em modificações na expressão gênica de enzimas e proteínas envolvidas no transporte de sacarose e acúmulo de fosfato inorgânico (Pi) (Douds, 2000; Lambais, 2000; Siqueira et al., 2010).

O processo de colonização parece ser altamente regulado, uma vez que a transformação de hifas em arbúsculos não ocorre em todas as células e a própria colonização só ocorre em regiões específicas da raiz (Silveira; Freitas, 2007). Entretanto os fatores são desconhecidos, mas a regulação envolve troca de sinais, controlada por fatores ambientais (Kiriachek et al, 2009). Dentre os fatores abióticos mais estudados está a influência da concentração de P no controle do desenvolvimento das MAs, controlando a taxa de colonização.

A absorção deste tão importante nutriente está diretamente relacionada com a necessidade de desenvolvimento da planta, de forma que, quando o P atinge as concentrações adequadas para a manutenção do crescimento vegetal, a colonização micorrízica pode ser inibida e incompatível com condições de altos níveis de nutrientes no solo. Ou seja, em condições ótimas a infecção é reduzida, tornando-se muitas vezes dispensável (Lambais, 2000). Assim, normalmente, concentrações mais altas de P no solo inibem a colonização das raízes, e as concentrações mais baixas, por sua vez, favorecem-na (Smith et al., 2011).

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar o efeito do fosfato no desenvolvimento das micorrizas arbusculares. O acúmulo de fosfatases em condições de alta concentração de P faria com que estas formem dímeros com lectinas na raiz, bloqueando a penetração do fungo ou inibindo o seu crescimento. Em contrapartida, uma menor quantidade de P no meio reduziria a síntese de fosfolipídio, tornando a membrana plasmática mais fluida e permeável, facilitando a penetração fúngica na raiz (Lambais, 2000). Mesmo com pouco conhecimento a respeito da influência do P no controle da simbiose micorrízica, acredita-se que as plantas tenham mecanismos auto-regulatórios na formação da simbiose, quando a concentração de fósforo afeta diretamente a infecção fúngica (Bucking; Heysler, 2003).

A simbiose micorrízica é conhecida, entre outras coisas, pela ação biofertilizadora sobre as plantas (Sampaio et al, 2012), por maximizar a absorção de nutrientes do solo através do aumento da área de absorção das hifas (Cavalcante et al, 2009). A ação biocontroladora se expressa na redução de danos e estresses causados pela ação de patógenos ou por fatores abióticos, como metais pesados e outros poluentes (Maia et al., 2005). Além disso, a associação micorrízica pode ajudar na melhor agregação das partículas do solo, auxiliando na recuperação de áreas degradadas, pelo aumento da biomassa vegetal e apresenta características bioquímicas diversas que refletem no acúmulo de certos metabólitos secundários (Carneiro, 2004).

Estudos transcriptômicos têm sido fundamentais para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na formação da micorriza arbuscular e o tomateiro é um dos modelos vegetais mais utilizados neste tipo de abordagem. Os padrões de expressão associados especificamente com estruturas da simbiose (arbúsculos e vesículas) foram explorados pela primeira vez em tomateiros por Balestrini, em 2007, através de microdissecção.

2.3 O sistema de defesa vegetal

Para protegerem-se contra os estresses bióticos (ataques de microrganismos patogênicos) e abióticos (mudanças climáticas, salinidade, poluição ambiental) os vegetais apresentam uma série de mecanismos de defesa, físicos ou químicos. Dentre as estratégias físicas, estruturais ou morfológicas, estão os espinhos e pelos, ceras e cutícula, enquanto que como defesa química produzem substâncias químicas como flavonoides, glicosídeos cianogênicos e inibidores protéicos, a partir dos quais podem ser criados outros derivados

através de enzimas que agem nas vias biossintéticas finais, o que resulta em modificações na bioatividade contra o organismo atacado (Soares; Machado, 2007).

A cutícula e parede celular vegetal constituem as primeiras barreiras encontradas pelos microrganismos durante o estabelecimento da infecção, pois eles necessitam secretar substâncias degradadoras que facilitem sua penetração, a exemplo da pectinase e celulase (Mussury et al., 2012). Esses compostos membranares podem formar complexos protéicos com açúcares, lipídeos e outras proteínas, podendo desempenhar também diversas funções no estabelecimento da simbiose micorrizica: a penetração da hifa na raiz se dá por uma combinação de pressão mecânica e degradação enzimática da parede celular vegetal por pectinases, celulasas e hemicelulasas fúngicas. O baixo nível de atividade dessas enzimas e a produção localizada das mesmas mantêm a integridade do tecido vegetal permitindo a colonização do FMA (Hallmann et al., 1997; Moreira; Siqueira, 2006).

O reconhecimento mútuo entre a planta hospedeira e o FMA se dá, na maioria das vezes, através de moléculas elicitoras, as quais podem ser endógenas (secretadas por microrganismos) ou exógenas (geradas através de clivagem química/ física da parede celular vegetal) e é acompanhado por mudanças na permeabilidade membranares, ativação de enzimas e liberação de sinais moleculares, resultando na ativação ou supressão de vários genes do sistema de defesa vegetal (Bari; Jones, 2009).



Figura 3: Esquema dos mecanismos de defesa após o reconhecimento entre simbioses durante a interação micorrízica arbuscular.

Sendo assim, durante a interação planta-patógeno, inúmeros mecanismos de defesa são ativados em consequência da infecção microbiana, acompanhados pelo aumento da concentração de espécies ativas de oxigênio (EAO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Soares, 2007). Respostas da planta à infecção, semelhantes àsquelas de ataques de patógenos, são observados durante a associação micorrízica, entretanto, reações de resistência são mais perceptíveis quando há incompatibilidade molecular entre FMA e plantas não hospedeiras, ou seja, em uma interação perfeitamente compatível são observadas respostas defensivas rápidas

e transitórias as quais poderiam ser justificadas pela indução de mecanismos de supressão da defesa, permitindo a penetração do fungo (Agrios, 2005). Dessa forma, a falta da Respostas de Hipersensibilidade após o reconhecimento do fungo micorrízico arbuscular (FMA) indica a não ativação, baixo nível de resposta ou a supressão do sistema de defesa da planta, com mudanças no nível de expressão de proteínas (Souza, 2006).

Algumas moléculas presentes na membrana celular dos FMA são idênticas às encontradas em fungos patogênicos e segundo Harris (2005), podem existir diferenças estruturais sutis entre elas. Análises bioquímicas e moleculares têm mostrado que moléculas relacionadas à defesa são liberadas durante o estabelecimento da simbiose, mas em baixos níveis e transitoriamente, quando comparado à reação da planta frente a um microrganismo patogênico. Além disso, alguns pesquisadores apontam para a possibilidade de os FMA induzirem alterações no hospedeiro vegetal, clivando essas moléculas e inativando-as, tornando-as incapazes de induzir reações defensivas, o que demonstra a necessidade de um grau elevado de combinação de sinalização celular e conversão desses sinais em respostas fisiológicas adequadas tanto para a defesa induzível - provocada por agressores pontuais - quanto para a permanente (Salzer et al., 2000; Kiriachek, 2009).

Os principais genes do sistema de defesa vegetal, já estudados em micorrizas arbusculares, estão associados à via biossintética de fitoalexinas isoflavonóides (chalcone-sintetase, chalcone-isomerase), à codificação de hidrolases que degradam a parede celular fúngica (quitinases, β -1,3-glucanases) e à codificação de proteínas envolvidas no aumento da rigidez da parede celular vegetal e em processos de oxi-redução (peroxidases, catalalases) (Souza, 2002; Kiriachek, 2009).

2.3.1 Proteínas relacionadas à patogênese: quitinase e β -1,3-glucanase

Quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas associadas à defesa das plantas contra patógenos, pois degradam os polissacarídeos quitina e β -1,3-glucana respectivamente (Lebeda et al., 2001).

As quitinases possuem atividade hidrolítica, sendo capazes de degradar as ligações β -1,4 entre os resíduos de N-acetilglucosamina da quitina componente de maior abundância na parede celular dos fungos em geral, representando, portanto, um importante componente na interação planta-fungo. Compreende uma família de seis classes de proteínas com diferentes estruturas moleculares e localizações espacial e temporal, além de substratos específicos com mecanismos hidrolíticos diversos (AAM et al., 2010).

Tem sido cada vez mais relatado o papel da quitinase como componente de defesa da planta, induzível em situações específicas e por isso elas são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese- PRs (Xie, 2010). A expressão de genes que codificam as PRs é induzida pela presença de patógenos (vírus, bactérias, fungos) ou fatores ambientais como salinidade e estresse hídrico (Van Loan et al., 2006).

Apesar de já existirem relatos de quitinases que mostraram atividade antifúngica *in vitro*, como as quitinases das classes I e V, aumentando a resistência vegetal (Seidl, 2008; Palma-Guerrero et al., 2009), o papel das mesmas em interações simbióticas ainda não está esclarecido. Entretanto, sabe-se que elas participam da interação de leguminosas com rizóbio e da micorrização (Salzer et al., 2000). No caso da simbiose nodular, há evidências de que a quitinase cliva e desativa uma parte dos fatores ‘Nod’- lipo-*quito-oligosacarídeos* (LCOs) bacterianos- caso não haja compatibilidade entre as raízes e a bactéria, os fatores Nod passam a ser reconhecidos como moléculas elicitoras, acionando a defesa vegetal, que se iguala àquela ativada pela presença de patógenos. Na micorrização, por outro lado, diante da compatibilidade entre os simbiontes, as quitinases vegetais clivam os LCOs fúngicos e reduzem a resposta de defesa da planta (Kiriachek, 2009).

Frettinger et al (2006) destacaram que a expressão de quitinases em raízes de *Mendicato trunculata* micorrizadas foi diferente da expressão das mesmas em raízes contendo rizóbios ou fungos patogênicos. Quitinases dos tipos III-2, III-3 e III-4 foram encontradas apenas nas raízes de *Mendicato trunculata* fortemente colonizadas por *Glomus intraradices*, não sendo induzidas durante o processo infeccioso com fungo patogênico *Phytophthora megasperma*. Em contrapartida, as quitinases do tipo I, II e IV não tiveram sua expressão aumentada em função da simbiose arbuscular.

No mesmo sentido, Costa e colaboradores (2010) verificaram o aumento na concentração de quitinases em porta enxertos de videiras inoculadas com *Glomus intraradices* e *Fusarium oxysporum*, que foi acompanhada de uma redução dos sintomas da doença, através da ativação temporária de respostas de defesa pela simbiose mutualística, que estimulou a expressão de diferentes isoformas da enzima.

A atividade de quitinases em tomateiros colonizados com FMA tem sido relacionada à capacidade da simbiose micorrízica proteger a planta frente a ataques de patógenos (Azcón-Aguilar et al., 2002). Raízes de tomateiro previamente inoculadas com *G. mossae* e infectadas com *Phytophthora parasítica* foram investigadas através de SDS-PAGE desnaturante, mostrando uma indução de isoformas de quitinases nas raízes colonizadas pelo FMA,

diferente das isoformas expressas nas raízes infectadas pelo fungo patogênico (Pozo, 1996). Esses trabalhos indicam uma regulação diferencial e específica em função da presença da simbiose arbuscular, que pode exercer efeito protetor contra microrganismos fitopatogênicos, evitando a redução das raízes em comparação com as não-inoculadas e reduzindo as lesões necróticas (Salzer, et al., 2000).

Os indutores do sistema defensivo vegetal podem atuar através da ação de moléculas elicitoras ou ativação de genes responsáveis pela codificação de fatores de resistência. A resposta de resistência inclui a morte celular programada, produção de metabólitos antimicrobianos e de proteínas relacionadas à patogênese, como a β -1,3 glucanases. As β -glucanases são enzimas multifuncionais que hidrolisam polissacarídeos como celulose e participam diretamente do controle biológico por estarem envolvidas na degradação da parede celular fúngica, além de atuar em diversos processos fisiológicos das plantas e respostas a estresses como infecções patogênicas (Kemp et al., 1999; Morohashi; Matsushima, 2000). A supressão de β -1,3 glucanases e do nível de mRNA codificando isoformas específicas dessas enzimas também tem sido observada em raízes micorrizadas, regulando o crescimento fúngico intraradicular e influenciando o controle da simbiose (Lambais; Mehdy, 1996; Pozo et al., 2002).

2.3.2 Enzimas antioxidantes: peroxidase e catalase

As enzimas do sistema antioxidante, como catalase, peroxidase ascorbato e peroxidase guaiacol, desempenham um importante papel nos processos oxidativos das células vegetais expostas a estresses ambientais. Em condições de baixa concentração de oxigênio no solo, há um aumento de radicais livres nas células, levando a modificações nas estruturas membranares e a danos celulares em função do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EAO) (Blilou et al., 2000). As espécies mais comuns de EAO são aquelas formadas como consequência da redução do oxigênio molecular (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH), que podem levar à peroxidação lipídica, inativação de enzimas e degradação de ácidos nucleicos (Lamb; Dixon, 1997).

A peroxidase está envolvida em muitos processos metabólicos da célula, como regulação do crescimento celular, biossíntese de lignina, proteção contra estresses bióticos e abióticos. Está localizada principalmente nos compartimentos vacuolares e na parede celular, por catalisar a oxidação de compostos fenólicos para formação de bifenilas hidrofóbicas,

polímeros ou quinonas, reforçando a parede vegetal contra a ação de certas enzimas e agindo como barreira física contra invasão de agentes patogênicos (Spanu; Bonfante-Fasolo, 1998; Blilou, 2000; Pereira, 2010). Tanto a peroxidase quanto a catalase são enzimas de defesa que protegem a célula contra danos oxidativos através da redução do H_2O_2 em O_2 e H_2O .

Durante a fase inicial da micorrização arbuscular também ocorre o aumento transitório no nível dos transcritos dessas enzimas de defesa, seguida, geralmente de supressão. A inoculação de raízes de alho com *Glomus vesiforme* resultou na regulação inicial de peroxidase, em 10 dias após a inoculação, quando comparado às plantas controles (Spanu; Bonfante-Fasolo, 1998); da mesma forma, Mathur e Vyas (1995) observaram o aumento do nível de peroxidase em função do aumento de P no solo, que induziu isoformas enzimáticas.

Lambais e colaboradores (2003) observaram aumento de transcritos de enzimas antioxidantes como catalase e peroxidase na fase inicial da colonização micorrízica, seguido de diminuição após o estabelecimento da simbiose. A presença de espécies ativas de oxigênio (EAOs) pode induzir essa expressão e deixar a parede celular vegetal permeável ao FMA; além disso, à medida que a colonização micorrízica é estabelecida, peroxidases relacionadas à defesa podem atuar no controle do crescimento fúngico e ao mesmo tempo proteger a planta contra patógenos presentes no solo. Em tomateiro, os estudos abordando a regulação diferencial de enzimas do sistema oxidativo são mais escassos, sendo relevantes trabalhos que identifiquem e caracterizem o comportamento gênico dessas enzimas.

2.4 Expressão diferencial de genes de tomateiros em resposta à inoculação com FMA

Para o estudo da regulação micorrízica através de diversas vias bioquímicas e moleculares, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de identificar genes diferencialmente regulados na presença das MAs. Para isso, estão sendo empregadas técnicas como hibridização em microarrays (arranjos ordenados de milhares de genes em lâminas de vidro), análises de EST (Expressed Sequence Tag), SAGE (Serial Analyses of Genes Expression), “display” diferencial de mRNA (Hibridização Subtrativa Supressiva) e PCR em tempo real. Essas técnicas estão permitindo a identificação de genes que estão tendo a sua função na simbiose micorrízica arbuscular determinada (Lapopin et al., 2001; Requena et al., 2002).

Muitos trabalhos têm sido realizados focando modificações da expressão gênica tanto mediante estresses bióticos e abióticos, quanto nos estágios iniciais da micorrização. Alguns autores têm caracterizado, por exemplo, genes codificadores de H⁺-ATPase (Requena et al., 2003). As H⁺-ATPases transportam prótons para o exterior das células, com consumo de ATP, acidificando a interface fungo-planta e com isso geram um gradiente eletroquímico que atua como força para a transferência dos nutrientes (Krajinski et al., 2002).

Estudos de H⁺-ATPases, também têm sido realizados utilizando raízes de tomateiro inoculadas com FMA. Nesse sentido, Ferrol e colaboradores, em 2002, estudando raízes de tomateiros mutantes, incapazes de formar micorrizas, tentou relacionar o desenvolvimento da associação à expressão gênica de H⁺-ATPases (LHA1 e LHA2) nas células radiculares. Nessa abordagem foram identificadas estruturas como arbúsculos e apressórios nas raízes colonizadas com *Glomus mossae*, enquanto que nas raízes das plantas não-micorrizadas não houve penetração no tecido epidérmico da raiz. Além disso, transcritos do LHA1 apresentaram supressão nas raízes micorrizadas, o que poderia indicar que a isoforma de H⁺-ATPases codificando LHA1 estaria envolvida na geração de gradiente de prótons necessário para adquirir o fosfato em células de raízes não micorrizadas, já que a captação de fosfato do solo para as raízes pode ser inativada durante o estabelecimento da simbiose micorrízica. Por outro lado, transcritos LHA2 foram estimulados, sugerindo que essa proteína contribui para energização da membrana arbuscular, necessária para direcionar a absorção do fosfato pelo hospedeiro vegetal, transferido pelo FMA.

O alto percentual de colonização, geralmente, encontra-se associado a uma maior expressão de genes codificando elementos transportadores de fosfato e também estão envolvidos na biossíntese de carotenoides relacionados à micorrização (Walter et al., 2007). Neste sentido, a quantificação dos níveis diferenciados de hormônios que estão relacionados à defesa. Lopez-Raez (2011), verificou que a simbiose implica em mudanças de fitohormônios influenciado pelas mudanças na expressão de genes que estão envolvidos na sua biossíntese.

Gomez-Ariza et al (2009) identificou em amostras do córtex, epiderme e cilindro central de células radiculares de tomate colonizadas com *Glomus mossae* 5 genes transportadores de fosfato inorgânico (Pi). LePT1 e LePT2 foram localizados na epiderme e tecido cortical, independentemente presença de FMA, indicando que as células corticais requerem Pi mesmo na ausência da associação. A localização desses transcritos na epiderme pode ocorrer devido ao fato de o Pi absorvido por essas células ser rapidamente transportado para outras camadas celulares, como as corticais, levando a uma baixa concentração de Pi na

epiderme e à expressão de LePT1 e LePT2. O gene LePT1 foi localizado também nas células do cilindro central, mas apenas em condições de deficiência de fósforo. Transcritos de LePT3, LePT4, e LePT5 estiveram presentes apenas nas células contendo arbúsculos, onde os FMA podem exercer controle sobre o Pi liberado para as células hospedeiras.

A regulação de alguns genes codificadores de proteínas transmembrana, envolvidos no transporte de nutrientes e água em função da micorrização, também vindo sendo alvo de trabalhos tendo o tomateiro como modelo vegetal. De acordo com Ouziad e colaboradores (2006) a expressão de genes codificadores de aquaporinas, por exemplo, em raízes de tomateiros cultivados sob estresse salino, também é influenciada pela micorrização. As aquaporinas são famílias de canais transmembrana que contribuem significativamente na passagem seletiva de água e parecem ser presumivelmente reguladas por FMA em condições de estresse salino (Gaspar, 2011). Apesar do número de transcritos terem sido alterados pelo efeito da salinidade, o efeito da presença de FMA nas raízes foi maior, mas ainda não estão claros os mecanismos envolvidos. Sabe-se que *Glomus geosporum* é encontrado em condições de salinidade e por isso pode conferir maior resistência à planta através de modificações na alocação de NaCl nas raízes.

Ouziad (2004) realizou um trabalho com tomateiros cultivados em solo com metais pesados, colonizados ou não com *Glomus intraradices*. Utilizando as técnicas moleculares Northern Blot e RT-qPCR, analisou a família de 5 genes- Lemt1, Lemt3, Lemt4, Nramp2 e LePCS1- envolvidos no transporte de metais pesados. Não houve regulação diferencial dos mesmos em quaisquer das condições analisadas: solo contaminado com metais pesados, solo controle, com ou sem FMA, apesar de nas análises de Northern Blot terem sido detectados sinais em baixa intensidade, indicando que estes genes podem estar envolvidos no aumento da tolerância a metais pesados em outras fases de vida da planta, diferentes da analisada. Entretanto, outro gene, Lemt2, relacionado à resistência à metais pesados foi expresso apenas em plantas cultivadas sob esse estresse. No mesmo sentido, a expressão de LeNramp3 e LeNramp1 foi três vezes menor em raízes colonizadas em solos com metais pesados.

Amplificações por PCR permitiram também identificar um novo transportador de nitrato (NRT2) em raízes de tomateiro, o qual teve sua expressão aumentada nos tratamentos com *Glomus intraradices*, demonstrando que a formação de MA afeta positivamente a alocação de nitrato (Hildebrandt, 2002). Schaarschmidt, et al. (2006) estudaram a expressão diferencial de uma invertase LIN6, que cumpre um papel essencial na micorrização arbuscular por estar envolvida no fornecimento de hexoses aos FMA. Através de RT-qPCR, foi

detectado um aumento de 3 vezes nos níveis de LIN6 11 semanas após a inoculação do tomateiro com *Glomus intraradices* e de 1,8 vezes após 5 semanas, enquanto que nas raízes não inoculadas o aumento foi de 12 vezes, indicando menor reação de indução de estresse.

Assim, a análise da expressão de genes em larga escala ou o estudo da regulação diferencial de genes específicos, em diferentes condições de cultivo ou fases de desenvolvimento, pode auxiliar a entender melhor os mecanismos da associação.

3. REFERÊNCIAS

- AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.L.; SORLIE, M.; VARUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitoooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1482-1517, 2010.
- AGRIBUSINESS 2008. FNP. Consultoria e comércio. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, p. 502, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, p.922, 2005.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, p. 824-827, 2005.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; JAIZME-VEGA, M.C.; CALVET, C. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. In: **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**, p.187-197, 2002.
- BALESTRINI, R., GÓMEZ-ARIZA, J., LANFRANCO, L., BONFANTE, P. Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 1055-1062, 2007.
- BARI, R.; JONES, J.D.G. Role of plant hormones in plant defense responses. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 473-478, 2009.
- BLILOU, I.; BUENO, P.; OCAMPO, J. A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Induction of catalase and peroxidase activities in tobacco roots inoculated with *Glomus mossae*. **Mycological Research**, v. 104, n.6, p. 722-725, 2000.
- BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. **VA Mycorrhizae**, v.1, p. 5-33, 1989.
- BUCKING, H.; HEYSER, W. Uptake and transfer of nutrients in ectomycorrhizal associations between photosynthesis and phosphate nutrition. *Mycorrhiza*, v. 13, n. 2, p. 59-68, 2003.
- CAMARGO FILHO, W. P.; DONADELLI, A.; SUEYOSHI, M. L. S.; CAMARGO, A. M. M. P Evolução da produção de tomate no Brasil. **Agricultura em São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 41-69, 1994.
- CAMARGO FILHO, W. P.; MAZZEI, A. R. Mercado mundial de tomate e o Mercosul. **Informações Econômicas**, v. 27, n. 10, p. 25-40, 1997.
- CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O. & DAVIDE, A.C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 34:119-125, 2004.
- CARVALHO, J.L.; PAGLIUCA, L.G. Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista HortiFruti Brasil**, 2007.

CAVALCANTE, U. M. T.; GOTO, B. T.; MAIA, L. C. Aspectos da simbiose micorrízica arbuscular. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 5, n. 6, p.180-208, 2009.

DOUDS, D.D.; NAGAHASHI, G. Signaling and recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. American Phytopathological Society Press. p. 11-18, 2000.

FABBRI, A.D.T. **Estudo da radiação ionizante em tomates in natura (*Lycopersicon esculentum* MILL) e no teor de licopeno do molho**. Tese Doutorado. São Paulo, 2009.

FAO. FAO STAT - Agricultural statistics database. Rome: **World Agricultural Information Centre**, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 12 ago. 2012.

FARIA, F. F.; OLIVEIRA, J. T. A. **Matriz de coeficientes técnicos da cultura do tomate de mesa: base para cálculo dos custos de produção e colheita**. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola, 2005.

FERROL N, POZO M.J.; ANTELO M.; AZCÓN-AGUILAR C. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants **Journal of Experimental Botany**, v. 53: 1638–1687

FRETTINGER P.; HERRMANN S.; LAPEYRIE F.; OELMÜLLER R.; BUSCOT F. Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 219–223, 2006.

GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p. 481-491, 2011.

GIORDANO, L. B.; ARAGÃO, F. A. S.; BOITEUX, L. S. Tomate para mesa. **Informe agropecuário**, v. 24, n. 219, p. 43-59, 2003.

GOMEZ-ARIZA, J.; BALESTRINI, R; NOVERO, M.; BONFANTE, P. Cell-specific gene expression of phosphate transporters in mycorrhizal tomato roots. **Biology and fertility of soils**, v. 45, n.8, p. 845-853, 2009.

IBGE. LSPA: **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v. 24 n. 4, p. 124, 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201104.pdf

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

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

HEINE, A. J. M. **Produção e qualidade do tomateiro híbrido lumi sob adensamento e condução de hastes**. Dissertação de mestrado. Vitória da Conquista, Bahia, 2012.

HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Physiologia plantarum**, v. 115, p. 125–136, 2002.

JENTSCHER, K.; THIEL, D.; REHN, F.; LUDWIG-MÜLLER, J. Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis. In *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. **Physiologist Plant**, v. 129, p. 320-333, 2007.

KEMP, G. et al. Disease development and β -1,3-glucanases expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 45-52, 1999.

KIRIACHEK, S. G.; AZEVEDO, L. C. B.; PERES, L. E. P.; LAMBAIS, M. R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.1, 2009.

KRAJINSKI F., HAUSE B., GIANNINAZZI-PEARSON V., FRANKEN P. Mth1, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbusculespecific induced expression in mycorrhizal tissue. **Plant Biology**, v. 4, p. 754–761, 2002.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. P. Doenças do tomateiro. Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. **Agronômica Ceres**, v. 2, p. 607- 626, 2005

LAMB, C; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 48, p. 251-275, 1997.

LAMBAIS, M.R. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. In: Podila, G.K.; Douds, D.D. **Current Advances in Mycorrhizae Research**. St. Paul: **American Phytopathological Society Press**. p.46-60, 2000.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and β -1,3-glucanase expression. **New Phytologist**, v. 134, p. 531–538, 1996.

LAMBAIS, M. R.; RIOS-RUIZ, W. F.; ANDRADE, R. M. Antioxidant response in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 169, n.2, p. 421-428, 2003.

LAPOPIN, L.; FRANKEN, P. Modification of plant gene expression. **Arbuscular Mycorrhizas: molecular biology and physiology**, p. 68-84, 2001.

LATEF, A. A. H. A. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annum* L). **Mycorrhiza**, v. 21, p. 495–503, 2011.

LEBEDA, A.; LUHOVÁ, L.; SEDLÁROVÁ, M.; JANCOVÁ, D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions: review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.108, p.89-111, 2001.

LIU, J. Y.; THIEU, A.T.; ENDRE, G. et al. Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant cell**, v. 15, n.9, p. 2016-2123, 2003.

LOPES C. A.; ÁVILA A. C. Doenças do tomateiro. **Brasília: Embrapa Hortaliças**, p. 151, 2005.

LÓPEZ-RÁEZ J. A.; CHARNIKHOVA T.; FERNÁNDEZ I.; BOUWMEESTER H.; POZO M. J. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato. **Journal Plant Physiology**, v. 168, n. 3, p.294-7, 2011.

LÓPEZ-RÁEZ J.A.; VERHAGE A.; FERNÁNDEZ I.; GARCÍA J.M.; AZCÓN-AGUILAR C.; FLORS V.; POZO M.J. Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 2589-2601, 2010.

MAIA, L.C.; SILVEIRA, N.S.S.; CAVALCANTE, U.M.T. Interaction between arbuscular fungi and root pathogens. In: RAI, M.K. **Handbook of Microbial Biofertilizers**. Haworth Press. p. 325–351, 2005.

MANARIM, L. K.; GALESKAS, H. Tomate. **Revista Hortifruti Brasil**, n. 99, p. 18, 2011.

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

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed.UFLA, p. 500-504, 2002.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of β -1,3- glucanase activity in germinated tomato seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 349, p. 1381-1387, 2000.

MUSSURY, R.M.; BETONI, R.; SILVA, M.A.; SCALON S.P.Q. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.14, n.1, 2012.

OLIVEIRA S. L.; FERREIRA M. D.; GUTIERREZ A. S. D. Valoração dos atributos de qualidade do tomate de mesa: um estudo com atacadistas da CEAGESP. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 214-219, 2012.

OUZIAD, F.; HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 634-649, 2004.

OUZIAD, F.; WILDE, P.; SCHMELZER, E.; HILDEBRANDT, U.; BOTHE, H. Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 57, p. 177–186, 2006.

PALMA-GUERRERO, J.; HUANG, I.C.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; LOPEZLLORCA, L.V.; READ, N.D. Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner. **Fungal Genetic Biology**, v. 46, p. 585–594, 2009.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Journal Brazilian Society Food Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PEREIRA, J.F.; MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C.; CASTRO, E. M.; ALVES, J.D. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho “Saracura”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n. 5, p.450-456, 2010.

PIROZYNSKI K. A.; MALLOCH D. W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **Biosystem**, v. 6, n. 3, p. 153-64, 1975.

POZO, M. J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J. M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.525-534, 2002.

POZO, M. J.; DUMAS-GAUDOT, E.; SLEZACK, S.; CORDIER, C.; ASSELIN, A.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; AZCON-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. **Agronomie**, v.16, n.10, p.689-697, 1996.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, p. 1920-1921, 2000.

REQUENA, N.; BREUNINGER, M.; FRANKEN, P.; OCÓN, A. Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Plant Physiology** v. 132, p. 1540-1549, 2003.

REQUENA, N.; MANN, P.; HAMPP, R.; FRANKEN, P. Early developmentally regulates genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae*. **Plant and Soil**, v. 244, p. 129-139, 2002.

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**, v. 151, p. 493-502, 2001.

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

SAMPAIO, D. B.; FILHO P. F. M.; MASCENA, A. M.; GOMES, V. F. F.; GUIMARÃES, F. V. A. Colonização micorrízica arbuscular e tolerância ao mal-do-Panamá em mudas de banana-maçã. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.3, 2012.

SANDRA, R. **Desinfestação de substratos e fungos micorrízicos na produção de porta-enxertos de citros**. Dissertação de mestrado. Rio Grande do Sul, 2012.

SCHAARSCHMIDT, S.; ROITSCH, T.; HAUSE, B. Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 15, p. 4015–4023, 2006.

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. **Fungal Biology Reviews**. v. 22, p. 36–42, 2008.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. F. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas: **Instituto Agronômico**, p. 312, 2007.

SIQUEIRA, J. O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E. J.B.N.; TSAI, S.M. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no brasil**.

SMITH, S. E. Impacts of Soil Microbes on Plant Population Dynamics and Productivity. **New Phytologist**, v. 156, p. 137–144, 2002.

SMITH, S. E.; JAKOBSEN, I.; GRONLUND, M.; SMITH F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition. **Plant Physiology**, vol. 156, p.1056-1057, 2011.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9, 2007.

SOUZA, A. F.; SILVA, I. C. L.; BERBARA, R. L. L. Fungos micorrízicos Arbusculares: Muito mais diversos do que se imaginava. **Fungos Micorrízicos Arbusculares. In: Biodiversidade**, p. 501-556, 2007.

SOUZA, S. L. **Análise do proteoma do fluido intercelular de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. Dissertação de Mestrado, Piracicaba, 2002.

SOUZA, S. L. **Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**. Tese de doutorado. Piracicaba, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Ed. Plantarum, 2008.

SOUZA, V. C.; SILVA, R. A; CARDOSO, G. D.; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista brasileira de engenharia agrícola ambiental**, v.10 n.3, 2006.

SPANU, P.; BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizae *Allium porum*. **New Phytologist**, v. 109, p.119-124, 1998.

TAKAHASHI, D. **Análises de sequências expressas em raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum***. Tese doutorado. Piracicaba, 2005.

TAMISO, L. G. **Desempenho de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL) sob sistemas orgânicos em cultivo protegido**. Dissertação de mestrado. Piracicaba, 2005.

VAN LOAN L. C.; REP M; PIETERSE C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62, 2006.

VITALE, A. A.; BERNATENE, A. E.; POMILIO, A. B. Carotenoids in chemoprevention: Lycopene. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**. v. 44, n.2, 2010.

XIE, YU-RONG et al. Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 121–130, 2010.

WALTER, J. M. **Ectomicorriza in vitro entre *Hydnangium* sp. e *Eucalyptus grandis* e análises de sequências de genes de *Hydnangium* sp.** Dissertação de mestrado. Viçosa, Minas Gerais, 2009.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do FMA *Glomus etunicatum* e de níveis de fósforo no solo sobre a expressão diferencial dos genes quitinase, glucanase, peroxidase e catalase, envolvidos na resposta de defesa do tomateiro.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da colonização de FMA na expressão dos genes *Chi3* (quitinase), *BGL2* (β -1,3-glucanase), *CAT2* (catalase) e *APX1* (peroxidase) em raízes colonizadas com *Glomus etunicatum* através de RT-qPCR.
- Verificar a influência de diferentes concentrações de fósforo no solo (3, 8 e 15 mg/dm³) sobre a modulação de genes *Chi3*, *BGL2*, *CAT2* e *APX1* nas raízes de tomateiro.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DA MICORRIZAÇÃO E DO FÓSFORO SOBRE A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE UMA QUITINASE EM RAÍZES DE TOMATEIRO (*Solanum esculentum*)

Clarissa F. O. Silva, Roberta L. O. Silva, Carolina B. Malafaia, Manassés D. da Silva, Ederson A. Kido, , Márcia V. Silva, Bartolomeu A. dos Santos, Leonor C. Maia.

Resumo

O tomateiro é uma solanácea herbácea com ampla capacidade adaptativa, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. Essa cultura vem sendo utilizada como modelo vegetal para o estudo da regulação micorrízica, em alternativa à *Arabidopsis thaliana*, pois possui ciclo de vida curto e genoma relativamente pequeno (950Mb), além disso são facilmente micorrizáveis. O estabelecimento das MAs envolve uma série de eventos bioquímicos e moleculares regulados por ambos simbiontes, ainda não totalmente esclarecidos. O estudo da expressão gênica em raízes colonizadas permitirá melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da simbiose, contribuindo para melhor aplicabilidade desta. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão diferencial dos genes *Chi3*, *BGL2*, *CAT2* e *APX1*, envolvidos na resposta de defesa do tomateiro em função da colonização com *Glomus etunicatum* e do nível de P no solo, através de RT-qPCR.

Introdução

O tomate (*Solanum esculentum* Mills) é uma solanácea com ampla capacidade adaptativa, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. A cultura do tomateiro exige um conjunto de medidas de proteção contra o ataque cíclico de patógenos, devido à vulnerabilidade que esta apresenta (Tamiso, 2005). O produtor, mesmo tendo à disposição uma gama de defensivos agrícolas, sempre está suscetível a grandes prejuízos, pois o cultivo deste fruto está vulnerável ao ataque de fungos, bactérias, vírus e namatóides, que limitam sua produção (Lopes; Ávila, 2005). Algumas dessas doenças só podem ser controladas mediante um adequado programa de manejo integrado (Kurozawa; Pavan, 2005), entretanto, alternativas têm sido apresentadas como aplicação de biocontroladores de doenças e pragas, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Maia et al., 2005).

Micorrizas arbusculares (MAs) são associações mutualistas entre raízes da maioria das plantas e fungos do filo Glomeromycota. O estabelecimento da MA pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos e a colonização nas raízes pode variar de acordo com a disponibilidade de P no solo. Em geral, se observa que, em condições de alta concentração de P, a colonização micorrízica é reduzida ou inibida, enquanto que baixos níveis de P facilita o estabelecimento da simbiose (Silveira; Freitas, 2007). Os mecanismos envolvidos nessa regulação ainda não são conhecidos com precisão, mas hipóteses envolvendo modificações na permeabilidade da membrana plasmática vegetal à açúcares e aminoácidos, em função da concentração de fosfato, tem sido documentada (Silveira; Freitas, 2007).

Durante a interação entre plantas e fungos patogênicos, podem ser observadas respostas de hipersensibilidade (RH), que geralmente não são observadas na formação das micorrizas arbusculares. A falta da RH após o reconhecimento do FMA indica baixo nível de resposta ou supressão do sistema de defesa da planta (Souza, 2006). Devido ao possível efeito

desses genes sobre o controle da simbiose, pesquisas recentes têm se concentrado na análise da sua expressividade ao nível de proteína e/ou mRNA (Ruiz-Lozano et al, 2001). Especial atenção vem sendo dada às quitinases, enzimas capazes de degradar as ligações β -1,4 entre os resíduos de N-acetilglucosamina da quitina, componente da parede celular dos fungos em geral. A atividade da quitinase é induzida em resposta a vários estímulos como etileno (Gomes, 2010), ácido salicílico e microrganismos patogênicos desempenhando um importante papel contra invasão de patógenos. Contudo, ainda existem limitações a respeito da função desempenhada pela quitinase no desenvolvimento da simbiose micorrizica arbuscular (Frettinger et al, 2006; Costa et al, 2010).

Neste trabalho, foram utilizadas raízes de tomate, como modelo para análise da expressão diferencial do gene *Chi3* sob o efeito da inoculação por fungo micorrízico *Glomus etunicatum* em diferentes concentrações de fósforo, através de PCR quantitativa em tempo real a fim de contribuir para um melhor entendimento dos processos de defesa vegetal envolvidos na micorrização arbuscular.

Materiais e Métodos

Material biológico e inoculação micorrízica

Sementes de tomate do cultivar Santa Clara I-5300 foram desinfestadas e postas para germinar em areia esterilizada. Após 8 dias da germinação as plântulas foram transferidas para sacos de polietileno preto, contendo areia e vermiculita (v/v 2:1), momento no qual inoculou-se os FMA, utilizando-se aproximadamente 100 esporos por planta. A coleta das raízes para avaliação da colonização e pesquisas moleculares foi realizada em 8, 15, 30 dias após a inoculação (dai).

As raízes presentes nas amostras de solo foram lavadas, diafanizadas e coradas com azul de Trypan (Philips, 1970). O percentual de colonização foi calculado pelo método de interseção dos quadrantes (Giovanetti; Mosse, 1980). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Extração de RNA total e síntese de cDNA

As amostras de RNA total de cada tratamento (inoculado e não-inoculado) foram extraídas das raízes coletadas, utilizando reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante e em seguida foram submetidas a corridas em gel de agarose para verificação da qualidade do RNA total extraído, procedendo-se ao tratamento com DNase (RNase-Free DNase Set 50) e quantificadas em nanodrop. Para síntese de cDNA utilizou-se o kit Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR (Qiagen), com o qual foi obtida uma fita simples de DNA a partir do mRNA, pela atividade da enzima transcriptase reversa.

Quantificação gênica por PCR em tempo real

Para a quantificação relativa do gene alvo *Chi3* e dos genes constitutivos EF-1 α e 18S rRNA, iniciadores específicos (primers) foram desenhados utilizando o programa Primer3 com pequenas modificações nos parâmetros padrão do programa (disponível em: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) que incluíam amplicom entre 70 a 100 pares de bases,

temperatura de dissociação (TM) do primer mínima de 40, ótima de 50 e máxima 60 e conteúdo GC variando de 45 a 55%.

Para confirmação da especificidade e eficiência dos primers, reações de amplificação do tipo RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 10 μL , sendo: 1 μL de cDNA, 1 μL de cada *primer* gene-específico (0,2 a 0,5 μM), 5 μL de *HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix 2X*[®] (USB[®]), 0,2 μL de fluoróforo passivo ROX (USB[®]) e 1,8 μL de água ultrapura estéril. As amplificações foram realizadas no termociclador Bioer, em triplicatas, com incubação inicial de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos. A normalização das leituras e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software fdpcr 4.1.00 (Bioer[®]) e o REST, com base na comparação entre as expressões do gene alvo e a expressão do gene controle constitutivo, pouco variável nas mesmas condições experimentais. Para cada par de *primer* foram avaliadas as curvas de dissociação dos produtos amplificados (curva de *melting*), com o intuito de verificar possíveis contaminações das três repetições de cada amplificação, além de controle negativo (amostra sem cDNA). Essa comparação foi realizada através do modelo matemático de Pfaffl, que calcula a taxa de expressão relativa de um alvo, baseada em uma reação de eficiência (E) e o ponto em que a fluorescência ultrapassa o limiar (Ct) de uma amostra conhecida *versus* o controle, relacionando posteriormente, a um gene de referência (Pfaffl et al. 2001). Foram considerados eficientes os primers cujos produtos de amplificação via PCR (amplicons) fossem únicos, com o peso molecular predito durante o desenvolvimento dos respectivos iniciadores.

Resultados

Colonização micorrízica

As taxas de colonização das plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* e cultivadas com baixo fósforo (BP), médio fósforo (MP) e alto fósforo (AP), são apresentadas na tabela 1. Como se pode ver, em amostras com baixa concentração de fósforo (BP) houve um aumento na taxa de colonização, que variou significativamente pelo teste de Tukey de 3,1% na primeira semana para 22% na segunda semana, mas não diferiu estatisticamente da segunda (22%) para a terceira semana (31%). Resultado semelhante foi encontrado nas raízes cultivadas sob condição de médio fósforo (MP), havendo uma expressiva variação de 3,8% a 18% da primeira para segunda semana de cultivo (Figura 1).

Tabela 1. Colonização vesicular por *Glomus etunicatum* (GE), de raízes de tomateiro, cultivadas com diferentes níveis de P, em função do tempo.

Níveis de P (mg/dm ³)	Dias após a inoculação (d.a.i.)		
	8	15	30
BP+GE	3,1aB	22aA	31aA
MP+GE	3,8aB	18aA	24aA
AP+GE	0bA	4,3bB	7,6bB

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($p < 0,05$)

Após 8 dias de experimento, a taxa de colonização de *G. etunicatum* não diferiu expressivamente entre os tratamentos com baixo e médio P, apresentando um percentual de 3,1% e 3,1%, respectivamente, o que é de se esperar, já que na primeira semana da formação da simbiose, poucas estruturas fúngicas estão presentes na raiz. Entretanto observa-se uma mudança relevante estatisticamente em relação à colonização de raízes quando cultivadas com AP ($p < 0,05$), pois não foram encontradas estruturas micorrízicas que indicassem infecção radicular (0%).

Em 15 d.a.i foi observado um aumento da presença de estruturas micorrízicas tanto nas amostras das raízes cultivadas com BP (22%), quanto naquelas cultivadas com MP (18%), não havendo diferença relevante estatisticamente ($p > 0,05$). Amostras de raízes com 30 dias de experimento, cultivadas com BP (31%) também não diferiram significativamente relação às cultivadas com MP (24%). Tanto em 15 quanto em 30 d.a.i, houve uma significativa redução do percentual micorrízico em função de fósforo (Tabela 1), indicando que uma maior concentração de P no meio, pode reduzir ou inibir a formação da simbiose micorrízica.

Ficou evidenciado que os maiores valores de colonização foram encontrados nas amostras com baixa concentração de fósforo presente na solução nutritiva aplicada. Como esperado, não se encontrou quaisquer estruturas relacionadas à micorrização nas amostras controle (não inoculadas com *G. etunicatum*), em todos os períodos analisados.

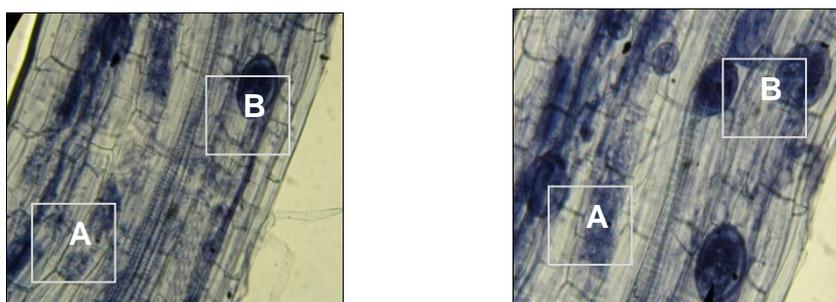


Figura 1: Arbúsculos (A) e vesículas (B) presentes nas amostras de raízes de tomateiro colonizadas com *Glomus etunicatum*

Análise da expressão de *Chi3* via RTq-PCR

Os transcritos do gene quitinase e os constitutivos 18S rRNA (Chen et al, 2011) e EF α -1 (Expósito-Rodríguez et al, 2008), apresentaram eficiência maior que 90%, sendo adequados para as análises de expressão relativa (Anexo 2). Entretanto, os melhores dados foram revelados quando considerado o gene EF α -1 como normalizador.

Para a quantificação do alvo *Chi3* foram utilizadas amostras de cDNA (Figura 3) obtidas a partir de RNAs anteriormente submetidos à análise de integridade através de corridas em gel de agarose. As bandas obtidas indicaram boa qualidade e a relação da densidade óptica de $A_{260/230}$ foi em torno de 1,8 indicando pouca contaminação com polissacarídeos e proteínas.

Assim, a expressão relativa da quitinase foi feita de acordo com três variáveis, que são a inoculação, nível de fósforo no solo e os tempos T0 (8 dias), T1 (15 dias) e T2 (30 dias).

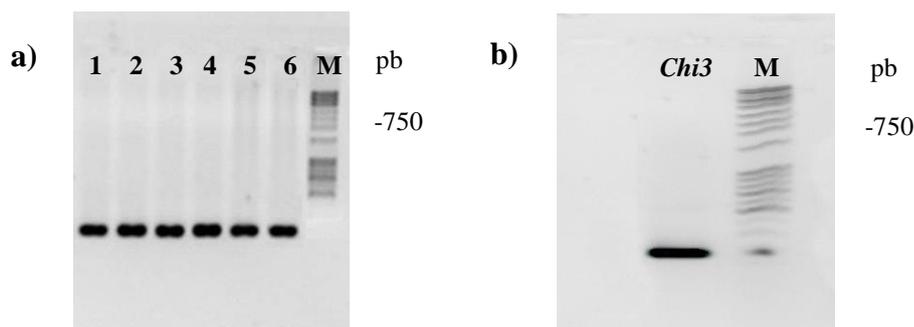


Figura 2: Em a, eletroforese em gel de agarose de fragmento amplificado via PCR pelo primer 18S rRNA com produtos de transcrição reversa de amostras de raízes de tomateiro T0/BP (1), T0/AP (2), T1/BP (3), T1/AP (4), T2/BP (5), T2/AP (6). Em b, amplificação do gene *Chi3*. (M) marcador peso molecular 1 kb ladder.

A análise da expressão da quitinase ao longo do tempo em raízes cultivadas com baixo fósforo revelou que houve uma redução no acúmulo de transcritos, variando de 13,95 em 8 d.a.i. a 0,01 em 30 d.a.i. (Tabela 2). Esses resultados foram semelhantes em raízes cultivadas em MP, encontrando-se uma variação de 11,25 na primeira semana de micorrização a 0,09 na segunda semana, seguida de um aumento não significativo em 30.d.a.i para 0,25 ($r > 1$). De uma forma geral, nas primeiras semanas de cultivos a expressão da quitinase foi induzida, enquanto que nas semanas seguintes, suprimida permitindo dessa forma o estabelecimento da simbiose. Em contrapartida, nas amostras cultivadas em altas concentrações de fósforo, houve um aumento da expressão de *Chi3* de 8 d.a.i (0,57 ns) para 15 d.a.i. (2,32 ns), mas de forma não significativa. Isso pode indicar que no início da formação micorrízica há um aumento temporário de genes do sistema de defesa vegetal, em resposta à presença do FMA.

Tabela 2. Análise por RTqPCR do nível da expressão relativa do gene *Chi3* em tomateiro inoculado com *Glomus etunicatum* (GE), cultivado com diferentes níveis de P, em função do tempo.

Níveis de P (mg/dm ³)	Dias após a inoculação (d.a.i.)		
	8	15	30
BP +GE	13,95 (8,42-23,12)aB	0,04 (0,02-0,06)aA	0,01 (0,00-0,03)aA
MP+GE	11,25 (5,85-21,66)aB	0,09 (0,02-0,51)aA	0,25 (0,05-1,19)aA
AP+GE	0,57 (0,17-1,9)bA	2,32 (0,64-8,35)aA	0,02 (0,02-0,01)bB

O gene EF α -1 foi usado como controle endógeno. Os dados representam a média de três repetições independentes, com os desvios padrão baseado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ($p < 0,05$).

Na avaliação do efeito da disponibilidade de fósforo sobre a expressão da quitinase, em cada tempo de desenvolvimento da associação, observou-se que em 8 d.a.i., *Chi3* foi super expressa em BP e MP, mas reduziu proporcionalmente com o aumento do teor de fósforo, chegando a 0,57 no tratamento com AP (ns), ou seja, a provável redução da colonização micorrízica (Tabela 1), pelo efeito de uma maior concentração de fósforo, manteve o nível de

quitinase baixo. Em 15 d.a.i e 30 d.a.i. *Chi3* manteve-se suprimida, independente do tratamento de fósforo aplicado, com exceção do tratamento com AP, que apresentou um aumento na expressão de 2,32, mas de forma não significativa, mostrando uma relação inversamente proporcional ao aumento do percentual da colonização micorrizica. À medida que a simbiose foi mantida ou aumentada, houve supressão gênica, que pode ser explicada pelo fato de já ter havido reconhecimento entre os simbiontes e conseqüentemente a micorrização já estar bem estabelecida, sendo desnecessária uma provável resposta de defesa vegetal.

Isso confirma que o desenvolvimento de MAs depende das condições do meio e torna-se importante diante da baixa disponibilidade de alguns elementos; além disso, esse resultado confirma que durante os primeiros estágios dessa formação pode haver um aumento temporário no nível de expressão dos genes do sistema de defesa vegetal.

Discussão

A técnica de PCR em tempo real vem sendo bastante empregada para o estudo da regulação diferencial em tomateiro, sobretudo para quantificação de genes envolvidos em processos patogênicos provocados por vírus, bactérias e fungos (Nascimento et al., 2013). Apesar de trabalhos de expressão diferencial em raízes de tomateiro inoculadas com FMA ainda serem escassos, alguns vêm demonstrando o comportamento diferencial da quitinase e seu envolvimento no controle do crescimento fúngico e na colonização micorrizica, junto a outras proteínas (Lambais; Mehdy, 1995).

A baixa taxa de colonização observada nos primeiros dias após a inoculação é devido ao fato de que no início da micorrização, há ainda poucas modificações morfológicas no córtex vegetal, tendo em vista que ainda não houve o total reconhecimento entre os simbiontes. A presença de quantidades significativas de arbúsculos e vesículas no período de 15 d.a.i. e 30 d.a.i., sugere transferência de parte da energia para o fungo e de minerais para a planta, com acúmulo de substâncias nas estruturas fúngicas, em decorrência da manutenção da simbiose (Angelini, 2008).

A regulação de quitinases geralmente ocorre quando há indução por estresse provocado por agentes patogênicos, químicos, físicos ou ambientais, mas, a presença de FMA parece induzir de forma específica novas isoformas de quitinases, variando de acordo com as espécies de FMA (Pozo, et al, 1996). Realizando um experimento do tipo “time-course”, Pozo (2002) observou que a atividade de isoformas de quitinase diminuiu de acordo com a idade da planta e desapareceu nos últimos estágios de desenvolvimento. Da mesma forma, no presente trabalho, durante a primeira semana de experimento (8 d.a.i.), houve um aumento temporário na expressão de *Chi3*, corroborando os resultados obtidos por Salzer e colaboradores (2000), em que a expressão de diferentes quitinases foi transitoriamente incrementada nos estágios iniciais da micorrização. Esse comportamento gênico é esperado devido à presença do FMA, que possui os mesmos componentes da parede celular de fungos patogênicos, como a quitina. Nas primeiras fases da infecção parece haver, então, um aumento enzimático de quitinases, enquanto que no segundo período de infecção micorrizica há uma provável diminuição, induzida pelo FMA associado (Lambais, 2003). Assim, o nível de expressão da quitinase manteve-se baixo a partir da segunda semana de experimento (15 d.a.i.).

Em contrapartida, achados de outros autores mostraram que mRNA codificando quitinases foram acumulados em altas concentrações de fósforo e nas fases tardias do desenvolvimento da simbiose (Lambais; Mehdy, 1998). Esses contrapontos podem ser explicados pelo fato de que a duração do experimento presente não foi suficiente para chegar ao estágio final da simbiose micorrizica, quando provavelmente, a quitinase retornaria ao seu nível de normalidade, não detectado nesse estudo.

Vários trabalhos vêm sendo relatados a respeito do possível efeito do fósforo no desenvolvimento da simbiose micorrizica (Vierheilig, 2004; Javot et al, 2007; Gómez-Ariza et al, 2009), mas o seu papel fisiológico não está claro. Em estudo a respeito da colonização do tomateiro, Araújo et al., em 1994, observou que o nível de fósforo disponível no solo influenciou a efetividade dos FMA nas raízes, mas sem aumento significativo de produção da matéria seca da parte aérea e radicular. Outros autores observaram que plantas de tomateiro inoculadas com FMA tiveram um incremento da matéria seca ou resistência contra patógenos (Salzer et al., 2000). Dennet e colaboradores realizaram em 2011, experimento no qual *Solanum centrale* J.M. Black- variedade de tomate presente na zona árida da Austrália- foi inoculado com três isolados de FMA- *Glomus* sp e *Glomus mossae*- utilizando solução nutritiva de Hoagland com baixa ($1,02 \text{ g.L}^{-1}$) e alta ($2,04 \text{ g.L}^{-1}$) concentração de P. Foi observada formação de micorrizas arbusculares em apenas uma das 12 plântulas inoculadas e tratadas com alta adição de P, enquanto que as plantas mantidas em baixo P tiveram uma média de 47.7% de colonização e aumento do peso seco. Fiorilli et al., em 2009, afirmou que genes envolvidos na resposta de defesa ou organização celular em tomateiro, foram identificados como diferencialmente expressos através de microarranjos e inicialmente modulados pelas mudanças nutricionais de fósforo. Raízes de batata infectadas com fungos micorrizicos arbusculares e cultivadas em solo com baixo P produziram uma pequena quantidade de etileno quando comparado às raízes cultivadas em condições de alto P e, sendo o etileno um importante regulador de genes relacionados à defesa, como a quitinase, ele permite o estabelecimento de uma simbiose funcional (Gomes, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que na primeira semana de experimento, a baixa concentração de fósforo permitiu o início da colonização micorrizica e, conseqüentemente, o gene da quitinase teve um aumento na expressão, como resposta temporária de defesa. Esse efeito indica também que a colonização pode beneficiar a planta em condições limitantes de nutrientes. Em contrapartida, a concentração mais elevada de fósforo pode interferir no estabelecimento da interação, limitando a colonização. Segundo alguns autores, o maior teor de P faria com que houvesse uma diminuição na permeabilidade da membrana, com conseqüente redução do efluxo de açúcares e aminoácidos, suprimindo o crescimento das hifas, enquanto que o exsudato de raízes cultivadas em condições de baixo P estimularia o desenvolvimento dos FMAs (Smith; Read, 1997).

Mesmo com informações limitadas a respeito da simbiose micorrizica, as plantas, juntamente com os FMA, possuem mecanismos auto-regulatórios que são afetados diretamente pela disponibilidade de nutrientes no solo, sobretudo pelo fósforo, o qual é um nutriente limitante. Assim, quando a absorção de fósforo atinge as concentrações adequadas, a colonização é automaticamente inibida, tornando a formação de MAs desnecessárias e até mesmo dispendiosa.

Quitinases vegetais devem desempenhar um importante papel no controle do desenvolvimento da simbiose. Sua função ainda não está totalmente clara, mas sabe-se que sua atividade pode envolver a degradação de elicitores de FMA, bem como elicitores liberados pelos FMA podem reduzir a capacidade da quitinase de induzir respostas de defesa (Souza, 2006). Durante a fase inicial da infecção, ela pode ser temporariamente induzida e logo depois suprimida, após o reconhecimento entre simbiontes, de forma a permitir a infecção, ou seja, a *Chi3* está envolvida na supressão de reações de defesa vegetal, nos estágios mais tardios. Dessa forma, percebe-se também que esta enzima apresenta uma relevante função como bioprotetora em processos infecciosos patogênicos. É possível sugerir, baseado nas informações obtidas, que experimentos futuros com modificações na planta para expressão do gene codificante da quitinase, possam elucidar seu papel efetivo na simbiose arbuscular.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos durante o trabalho pode-se concluir que a alta concentração de fósforo na solução nutritiva inibiu o desenvolvimento da micorriza arbuscular e como consequência a expressão da quitinase foi reduzida, já que respostas de defesa temporárias seriam desnecessárias. Nas raízes coletadas durante os primeiros dias após a inoculação, este gene foi superexpresso em relação às amostras coletadas aos 15 e 30 d.a.i. Isso demonstra que quitinases vegetais devem desempenhar um importante papel no controle da simbiose micorrízica, sendo necessários experimentos futuros, com o intuito de definir sua essencialidade na associação.

Referências

ANGELINI, G. A. R. **Seleção de fungos micorrizicos arbusculares e ectomicorrizicos para simbioses eficientes com leguminosas arbóreas do gênero Acacia**. Dissertação de mestrado. Seropédica, 2008.

ARAÚJO, W.P. Aspectos nutricionais da cultura do tomateiro. In: **Seminário de Atualização Cadeia Produtiva do Tomate**. Feagri, 2004.

ARAÚJO, A. P.; SILVA, E. M. R.; ALMEIDA, D. L. Efetividade de fungos endomicorrízicos em tomateiro em diferentes níveis de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 193-199, 1994

BROGLIE, K., CHET, I., HOLLIDAY, M., CRESSMAN, R., BIDDLE, P., KNOWLTON, S., MAUVAIS, C. J., AND BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science** 254:1194-1197, 1991.

CHEN, S.; GU, H.; WANG, X.; CHEN, H.; ZHU, W. Multiplex RT-PCR detection of Cucumber mosaic virus subgroups and Tobamoviruses infecting Tomato using 18S rRNA as an internal control. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, n. 6, p. 465-471, 2011.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M; BORGES, A. A.; PÉREZ, A. B.; PÉREZ, J. A. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, p. 131-143, 2008.

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

GOMES, G. M. Desenvolvimento de micorrizas arbusculares em mutantes hormonais de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). **Tese de doutorado**. Piracicaba, 2010.

GÓMEZ-ARIZA J.; BALESTRINI R.; NOVERO, M.; BONFANTE, P. Cell-specific gene expression of phosphate transporters in mycorrhizal tomato roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 845–853, 2009.

HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1-8, 2002

FIORILLI, V.; CATON, M.; MIOZZI, L.; NOVERO, M.; ACOTTO, G. P.; LANFRANCO, L. Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v. 184, n. 4, p. 975-987, 2009.

FRETTINGER P.; HERRMANN S.; LAPEYRIE F.; OELMÜLLER R.; BUSCOT F. Differential expression of two class III chitinases in two types of roots of *Quercus robur* during pre-mycorrhizal interactions with *Piloderma croceum*. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 219–223, 2006.

JAVOT H.; PENMETSAS V. R.; TERZAGHI N.; COOK D. R.; HARRISON M. J. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 1720–1725, 2007.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.P. Doenças do tomateiro. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2, p. 607- 626, 2005.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Can. J. Bot.**, v. 73, p. 533-540, 1995.

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

LAMBAIS, M. R.; RIOS-RUIZ, W. F.; ANDRADE, R. M. Antioxidant response in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist, Oxford**, v. 169, n.2, p. 421-428, 2003.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2013.

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

POZO, M.J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J.M.; AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.525-534, 2002.

POZO, M.J.; DUMAS-GAUDOT, E.; SLEZACK, S.; CORDIER, C.; ASSELIN, A; GIANINAZZI, S; GIANINAZZI-PEARSON, V; AZCON-AGUILAR, C; BAREA, J.M Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. **Agronomie**, v.16, n.10, p.689-697, 1996.

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**, v. 151, p. 493-502, 2001.

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

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. F. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas: **Instituto Agronômico**, p. 312, 2007.

SOUZA, S. L. **Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular**. Tese de doutorado. Piracicaba, 2006.

SMITH, S. E.; READ, D. J. "Mycorrhizal Symbiosis," 2nd/Ed. Academic Press, London, UK, 1997.

TAMISO, L. G. Desempenho de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL) sob sistemas orgânicos em cultivo protegido. **Dissertação de mestrado**. Piracicaba, 2005.

VIERHEILIG, H. Regulatory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, p. 1166-1176, 2004.

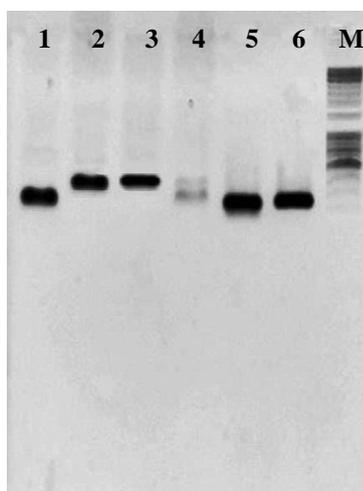
5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram que a concentração de fósforo na solução nutritiva pode influenciar no desenvolvimento da micorriza arbuscular e como consequência a expressão da quitinase. Nas raízes coletadas durante os primeiros dias após a inoculação, este gene foi superexpresso em relação às amostras coletadas aos 15 e 30 d.a.i. Isso demonstra que quitinases vegetais devem desempenhar um importante papel no controle da simbiose micorrízica. Sendo assim, temos como perspectivas de continuação deste trabalho experimentos necessários para definir sua essencialidade na associação.

6. ANEXOS

6.1. Reações de cDNA dos alvos APX, CAT, BGL2 e *Chi3*

Os oligonucleotídeos peroxidase, catalase e β -1,3 glucanase não foram funcionais para o trabalho em questão, uma vez que não foram eficientes nas reações de PCR em tempo real, dessa forma, não puderam ser validados. Entretanto, foram realizadas reações de cDNA dos mesmos com o primer constitutivo 18S rRNA, sendo obtidas os padrões de bandas a seguir.



Figuras 8: Reação dos alvos peroxidase (1), catalase (2), quitinase (3) e β -1,3 glucanase (4) com o primers controle 18S rRNA. (M) marcador peso molecular 1 kb ladder.

6. 2. Gráficos da obtenção da eficiência dos primers

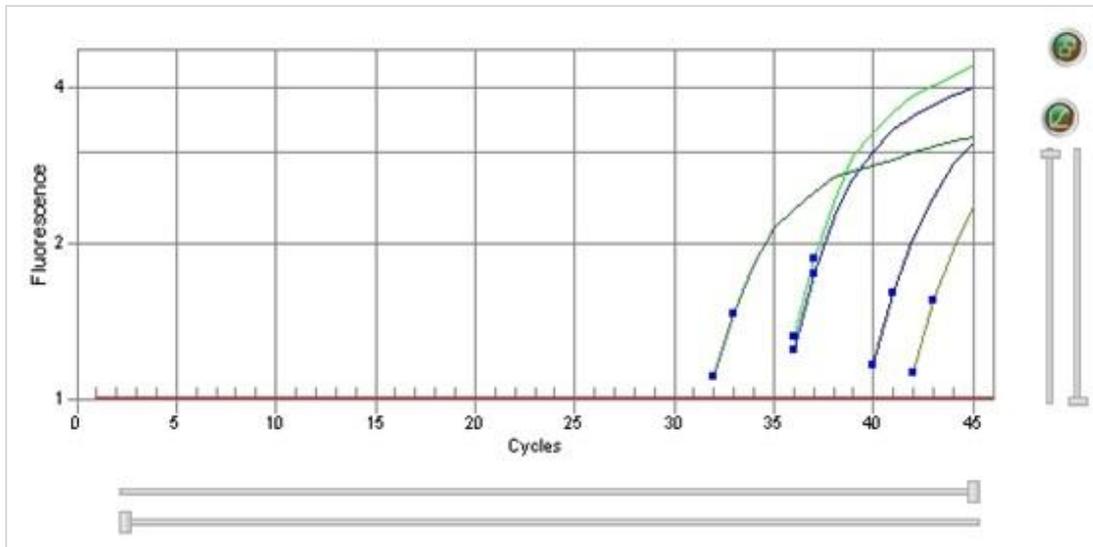


Figura 1: Quantificação absoluta de cinco diluições seriadas (1, 1:10, 1:1000, 1:10.000) para *Chi3*.

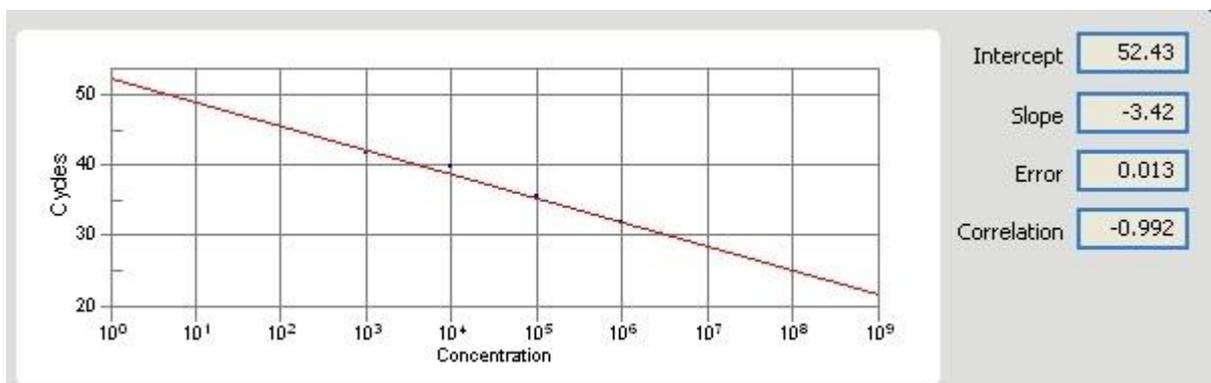


Figura 2: Curva de eficiência para *CHI3* resultante da quantificação absoluta de 5 diluições seriadas (1,1:10... ..1:10.000) e seus respectivos valores de Slope.

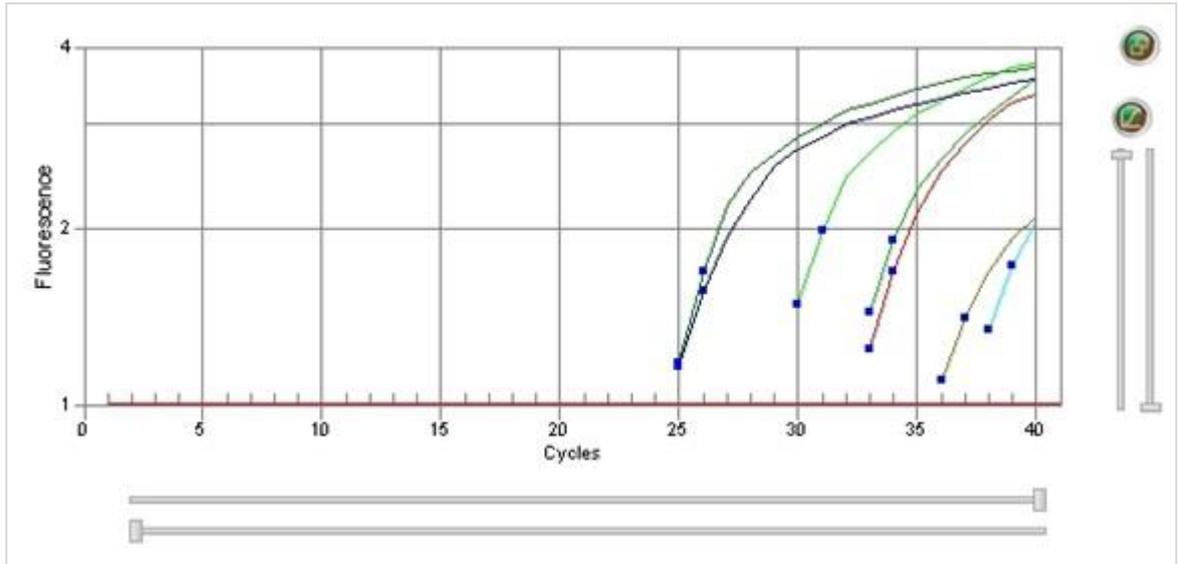


Figura 3: Quantificação absoluta de cinco diluições seriadas (1, 1:10, 1:1000, 1:10.000) para *EFa-1*.

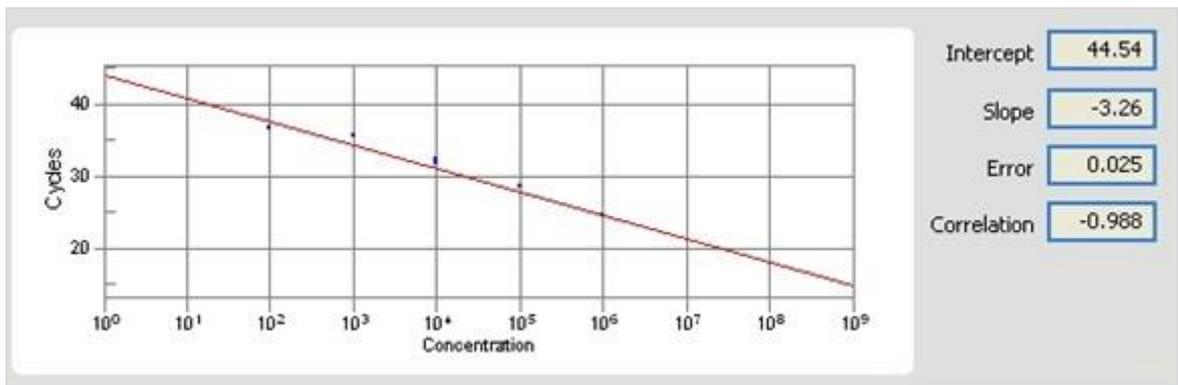


Figura 4: Curva de eficiência para *EFa-1* resultante da quantificação absoluta de 5 diluições seriadas (1, 1:10... ..1:10.000) e seus respectivos valores de Slope.

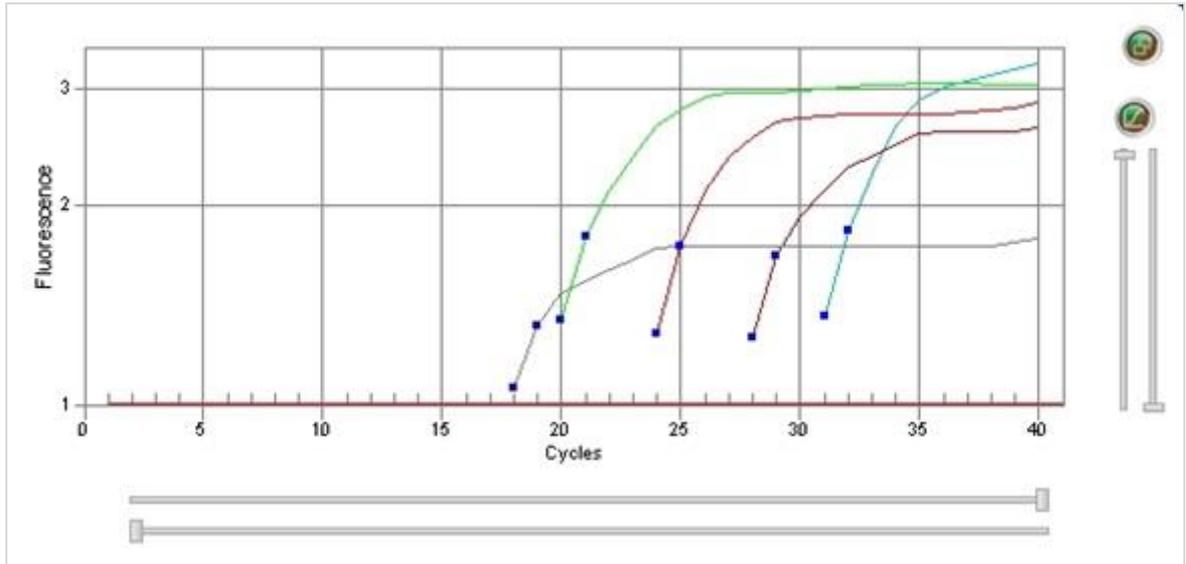


Figura 5: Quantificação absoluta de cinco diluições seriadas (1, 1:10, 1:1000, 1:10.000) para 18S rRNA

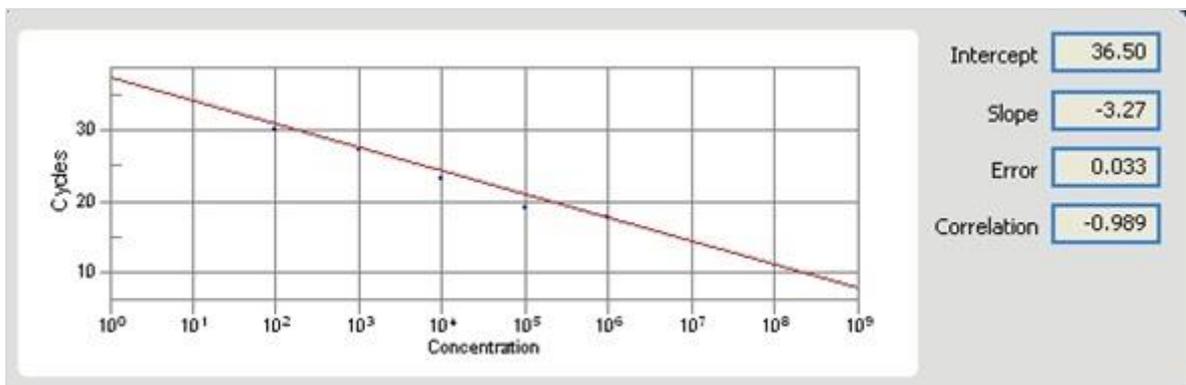


Figura 6: Curva de eficiência para 18S rRNA resultante da quantificação absoluta de 5 diluições seriadas (1, 1:10... ..1:10.000) e seus respectivos valores de Slope

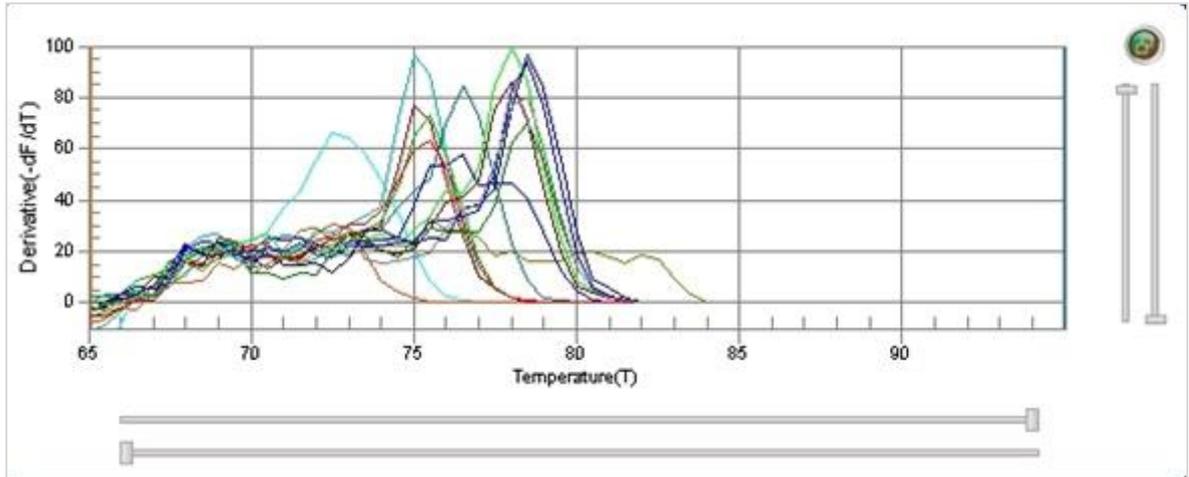


Figura 7: Curva de dissociação ou desnaturação do produto de amplificação de *CHI3*

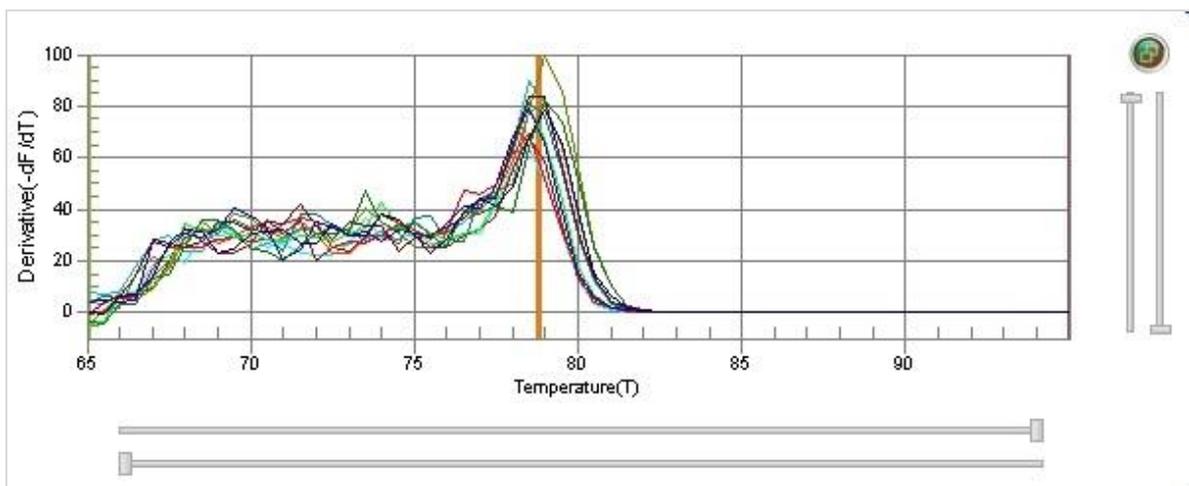


Figura 8: Curva de dissociação ou desnaturação do produto de amplificação de 18S rRNA

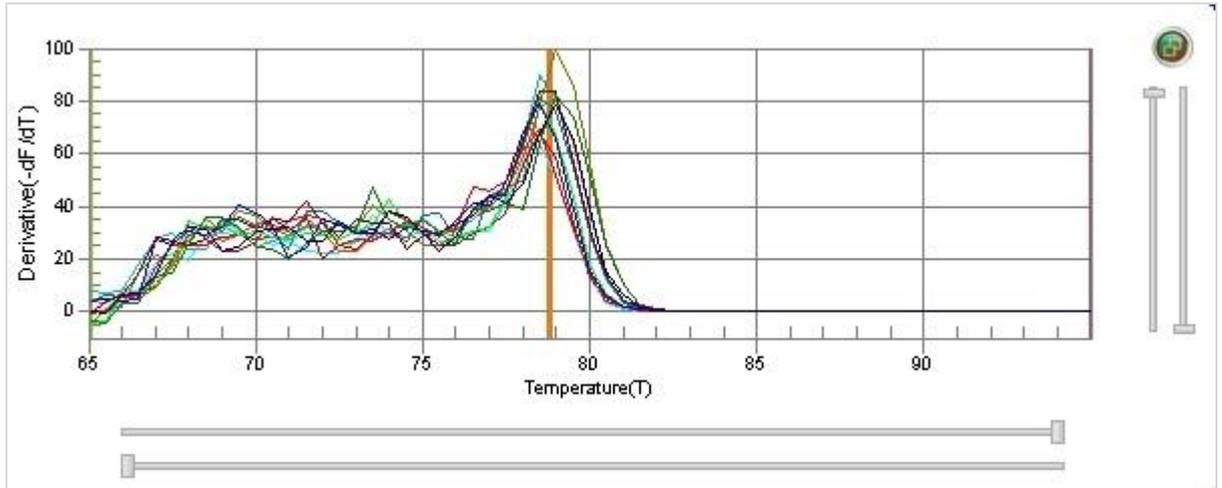


Figura 9: Curva de dissociação ou desnaturação do produto de amplificação de *EFα-1*

6.3. Tabela de pares de oligonucleotídeos

Gene	Primers
Quitinase (<i>Chi3</i>)	5'-ATGGTGGTAGTGCAGGAACATT-3' 5'-GCTCGTTCGTAGTTAGATTGGTGTG-3'
Catalase (CAT)	5'-TACAAGTACCGTCCGTCAAGTG-3' 5'-TGGTAATCCTCAAGCAACACAG-3'
Peroxidase (APX1)	5'-AGGAAACTCAGAGGACTCATTGC-3' 5'-CACATCGTAGGTACCAGCAGAG-3'
β-1,3 glucanase (BGL2)	5'-ACCATTTGTCTTCTCCTCTTCG-3' 5'-GTAAGTTGTTAGCTACACGTCCA-3'
EF1α	5'-TCAGGCTGACTGTGCTGTTCTCAT-3' 5'-GACACCAAGGGTGAAAGCAAGCAA-3'
18S rRNA	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'