

Expressão diferencial de genes relacionados às vias de biossíntese de etileno e ácido abscísico em mutantes de tomateiro *epinastic* e *sitiens* colonizados por *Glomus clarum*⁽¹⁾.

Giselle Gomes Monteiro Fracetto⁽²⁾; Felipe José Cury Fracetto⁽³⁾; Marcio Rodrigues Lambais⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

⁽²⁾ Professor; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, PE; fracetto@depa.ufrpe.br. ⁽³⁾ Pós-Doutorando; Universidade Federal Rural de Pernambuco. ⁽⁴⁾ Professor; Universidade de São Paulo (ESALQ-USP).

RESUMO: Tem sido proposto que, além do etileno, o hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) exerce uma importante função no estabelecimento e desenvolvimento da micorriza arbuscular (MA). Para verificar se a colonização reduzida observada em mutantes *sitiens* (*sit*) é dependente da produção de etileno, os mutantes de tomateiro superprodutor de etileno, *epinastic* (*epi*) e deficiente em ABA (*sit*) foram inoculados com *G. clarum*. A expressão diferencial dos genes que codificam enzimas chave na via de biossíntese do etileno (*LeACO4*) e na via de biossíntese de ABA (*LeNCED*) foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. A colonização intrarradicular de *G. clarum* nos mutantes *epi* e *sit* foi significativamente reduzida em relação ao MT. O gene *LeACO4* apresentou indução no acúmulo de transcritos em raízes micorrizadas de MT, enquanto que em raízes micorrizadas do mutante *epi* não foi observado aumento do acúmulo de transcritos, demonstrando que *LeACO4* é regulado positivamente pela inoculação com *G. clarum*. Além disso, *LeACO4* foi significativamente induzido em *sit* mostrando que a superprodução de etileno observada neste mutante pode ser via ACC oxidase. Por fim, indução no acúmulo de transcritos do gene *LeNCED* foi observada em todos os genótipos micorrizados, demonstrando que *LeNCED* é regulado positivamente pela inoculação com *G. clarum* e que o etileno regula a expressão de *LeNCED*. A superprodução de etileno e a deficiência em ABA contribuem para a susceptibilidade do tomate à infecção por *G. clarum*.

Termos de indexação: micorriza arbuscular, Micro-Tom, PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

Micorriza arbuscular (MA) é uma associação simbiótica entre fungos da divisão Glomeromycota e a maioria das espécies vegetais (Smith & Read, 2008). Essa simbiose é uma estratégia eficaz que melhora o estado nutricional de ambos os parceiros. O estabelecimento e funcionamento da simbiose requerem um alto grau de coordenação entre os dois parceiros com base em um diálogo molecular

finamente regulado (Hause et al., 2007). Algumas das alterações fisiológicas que ocorrem no hospedeiro durante a simbiose estão relacionadas a modificações na abundância relativa de fitormônios (Hause et al., 2007).

Sabe-se que o etileno, um fitormônio gasoso com várias funções no crescimento e desenvolvimento da planta, é um modulador na regulação da formação e desenvolvimento das MAs (Zsögön et al., 2008; Fracetto et al., 2013). A superprodução de etileno reduz a colonização micorrízica, como demonstrado no mutante *epi* de tomateiro, enquanto que a insensibilidade ao etileno (mutante *Never ripe*), aumenta a taxa de colonização nos estágios iniciais do desenvolvimento da MA. Aos 16 dias após a inoculação, os níveis de transcritos codificando enzimas anti-oxidantes eram maiores e os transcritos codificando *Chi3* e *Chi9* eram menores do que a planta selvagem (Fracetto et al., 2013). Esses resultados mostram que os efeitos do etileno são mais provavelmente através da modulação da via de sinalização que regula o sistema de defesa vegetal.

Tem sido proposto que ABA também é necessário para o desenvolvimento de MAs. Decréscimo na colonização intrarradicular por *Glomus intraradices* foi observado no mutante de tomateiro *sitiens* (deficiente em ABA) em relação às plantas selvagens (Herrera-Medina et al., 2007). Rodriguez et al. (2010) demonstraram que *sitiens* tem uma grande limitação na colonização fúngica intrarradicular bem correlacionada com sua incapacidade na biossíntese de ABA, e que este mutante produz altos níveis de etileno.

O objetivo deste trabalho é determinar se o desenvolvimento de MA em mutantes hormonais de tomateiro da cultivar Micro-Tom superprodutor de etileno (*epinastic*) e deficiente em ABA (*sitiens*) está associada à expressão de genes que codificam enzimas da via biossintética do etileno (ACC oxidase) e da via biossintética do ABA (NCED).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e fungo micorrízico arbuscular (FMA)



Mutantes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Syn *Solanum lycopersicum* L.) superprodutor de etileno (*epinastic*), e deficiente em ABA (*sitiens*) foram obtidos do “Tomato Genetic Research Center” (Universidade da Califórnia, Davis) e introgrididos no modelo genético Micro-Tom (MT), obtidos de “Weizmann Institute of Science” (Israel). *Glomus clarum* foi multiplicado em associação com raízes de *Brachiaria decumbens* em vasos contendo areia e vermiculita como substrato, em condições de casa-de-vegetação. Sementes de MT e dos mutantes *epinastic* (*epi*) e *sitiens* (*sit*) foram semeadas em bandejas de isopor® contendo substrato esterilizado composto por areia lavada e vermiculita (2:1, v/v). Plântulas que apresentavam três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos plásticos contendo 400 g do substrato e adubadas de acordo com Fracetto et al. (2013).

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

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

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

Para avaliação da colonização micorrízica, as raízes foram tratadas com de KOH 10% a 90 °C por 30 min e transferidas para uma solução 5% de tinta QuInk diluída em solução de ácido acético 5% a 90 °C durante 3 min, lavadas em ácido acético 5% e armazenadas em lactoglicerol. A taxa de colonização foi determinada pela presença de estruturas fúngicas no tecido cortical de acordo com Giovanetti e Mosse (1980).

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

Extração de RNA, síntese de cDNA e análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

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

A concentração e pureza de RNA total foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm. A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2 % utilizando-se brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para visualização do mesmo.

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

A expressão dos genes que codifica as enzimas ACC oxidase (*LeACO4*) e 9-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (*LeNCED1*) foi determinada utilizando análises de RT-qPCR, e o gene do rRNA 18S como um controle constitutivo. Os iniciadores foram *LeACO4* (Anstead et al., 2009) e *LeNCED* (Nitsch et al. 2009) As reações de PCR foram realizadas em solução contendo 1 µL da diluição de cDNA 1:10 (v/v), 10 µM de cada iniciador e 5 µL de Platinum SYBR-Green qPCR Super Mix-UDG 2X (Invitrogen), para um volume final de 10 µL. As condições das reações e a curva padrão foram feitas de acordo com Fracetto et al. (2013).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colonização micorrízica no mutante superprodutor de etileno *epi* foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao controle MT. Já o mutante *sit* apresentou redução significativa na taxa de colonização tanto em relação a MT quanto ao mutante *epi* (Figura 1). Esses resultados corroboram os dados da literatura mostrando que a superprodução de etileno e a deficiência em ABA reduzem o desenvolvimento da MA (Rodriguez et al., 2010; Fracetto et al., 2013)

O padrão de crescimento do fungo no interior das raízes foi indicativo da colonização tipo Arum, com arbusculos e vesículas abundantes (Figura 2A). Entretanto, várias alterações morfológicas foram



detectadas nos mutantes *epi* e *sit*. Presença de hifas extra- e intrarradiculares, sem o desenvolvimento de arbúsculos e vesículas (Figura 2B) e ramificação anormal de hifas septadas (Figura 2C) foram observadas no mutante *epi*. Infecção limitada (Figura 2D), formação incompleta de arbúsculos (Figura 2E) e abundância de hifas externas de *G. clarum* sem colonização intrarradicular (Figura 2F) foi observado em *sit*.

O nível de transcritos de *LeACO4* em raízes micorrizadas de MT foi 3 vezes maior do que em raízes de MT não inoculadas ($p < 0,05$). O mutante *epi* apresentou aumento significativo no acúmulo de transcritos de *LeACO4* em raízes não inoculadas ($p < 0,05$), sendo duas vezes maior em relação as raízes de *epi* micorrizadas. O acúmulo de transcritos de *LeACO4* nas raízes do mutante *sit* micorrizadas foi 6 vezes maior ($p < 0,05$) do que em raízes de *sit* não inoculadas (Figura 3A).

O acúmulo de transcritos de *LeNCED* está apresentado na Figura 3B. Todos os genótipos apresentaram indução significativa ($p < 0,05$) no acúmulo de transcritos em raízes micorrizadas, sendo que o mutante *sit* foi o que apresentou uma maior indução chegando a ser 3 vezes maior do que em MT. Esses resultados demonstram que, assim como o etileno, ABA também exerce um efeito no desenvolvimento da MA

A via de sinalização de ABA interage antagonicamente com a via de sinalização do etileno. Já foi demonstrado que a redução na colonização por *G. intraradices* no mutante *sit* se deve, pelo menos em parte, ao acúmulo de etileno. A aplicação de tiosulfato de prata demonstrou que o bloqueio da percepção do etileno aumentou o desenvolvimento da MA, evidenciando que a percepção é essencial para a formação da simbiose (Herrera-Medina et al., 2007). De fato, o acúmulo de transcritos de *LeACO4* foi induzido em raízes micorrizadas do mutante *sit*.

Como sugerido em um estudo comparativo dos transcriptomas de raízes micorrizadas de tomateiro e do mutante *sit*, a diminuição na formação da MA em *sit* pode estar associada à indução de genes relacionados à defesa vegetal e modificação da parede celular (Garrido et al., 2010). Entretanto, dois genes induzidos nas raízes micorrizadas de *sit* (*Endo-Q* e *β -Exp*) foram induzidos também com a aplicação exógena de etileno, mostrando que a via do etileno pode ter relevância na regulação da expressão de genes de defesa e modificação da parede celular, os quais parecem ser os genes com maiores alterações de expressão em raízes de mutantes micorrizadas deficientes em ABA.

CONCLUSÕES

A superprodução de etileno e a deficiência em ABA contribuem para a susceptibilidade do tomate à infecção por *Glomus clarum*;

O gene que codifica a enzima chave na biossíntese do etileno (*LeACO4*) é regulado positivamente pelo FMA;

O gene que codifica a enzima chave da via de biossíntese de ABA (*LeNCED*) é regulado positivamente pelo FMA tanto na planta selvagem MT quanto no mutante deficiente em ABA e superprodutor de etileno, mostrando que etileno exerce um efeito na regulação de *LeNCED*.

REFERÊNCIAS

- ANSTEAD, J., et al. Activation of ethylene-related genes in response to aphid feeding on resistant and susceptible melon and tomato plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134:170-181, 2010.
- FRACETTO, G.G.M., et al. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhizal development and levels of plant. *Symbiosis*, 60:155-167, 2013.
- GARRIDO, J.M.G., et al. Variations in the mycorrhization characteristics in roots of wild-type and ABA-deficient tomato are accompanied by specific transcriptomic alterations. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23:651-664, 2010.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, 84:489-500, 1980.
- HAUSE, B., et al. Jasmonates in arbuscular mycorrhizal interactions. *Phytochemistry*, 68:101-110, 2007.
- HERRERA-MEDINA, M.J., et al. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhizal. *New Phytologist*, 175:554-564, 2007.
- NITSCH, L.M.C., et al. Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta*, 229:1335-1346, 2009.
- PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:2001-2007, 2001.
- RODRIGUEZ, J.A.M., et al. Mycorrhization of the notabilis and sitiens tomato mutants in relation to abscisic acid and ethylene contents. *Journal of Plant Physiology*, 167:606-613, 2010.
- SMITH, S.; READ, D.J. *Mycorrhizal symbiosis*. Amsterdam: Academic Press, 2008. 769 p.
- ZSÖGÖN A., et al. Reduced arbuscular mycorrhizal colonization in tomato ethylene mutants. *Scientia Agricola*, 65:259-267, 2008.

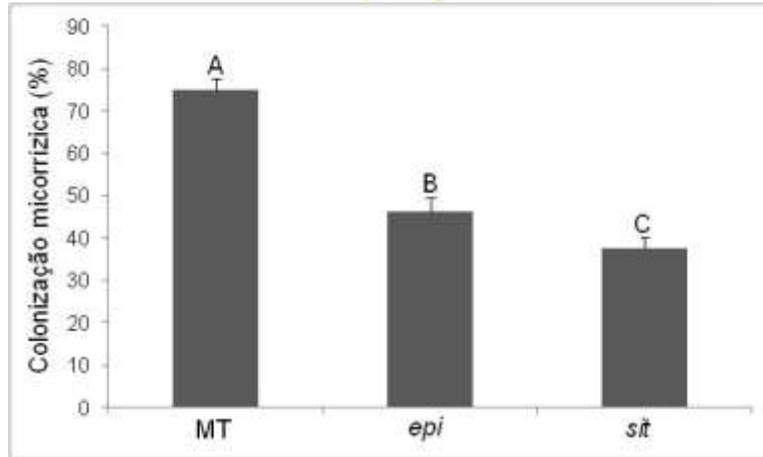


Figura 1 – Porcentagem de colonização intrarradicilar em tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes superprodutor de etileno (*epi*) e deficiente em ácido abscísico (*sit*) inoculados com *Glomus clarum*. Os dados são médias de 6 repetições. As barras representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

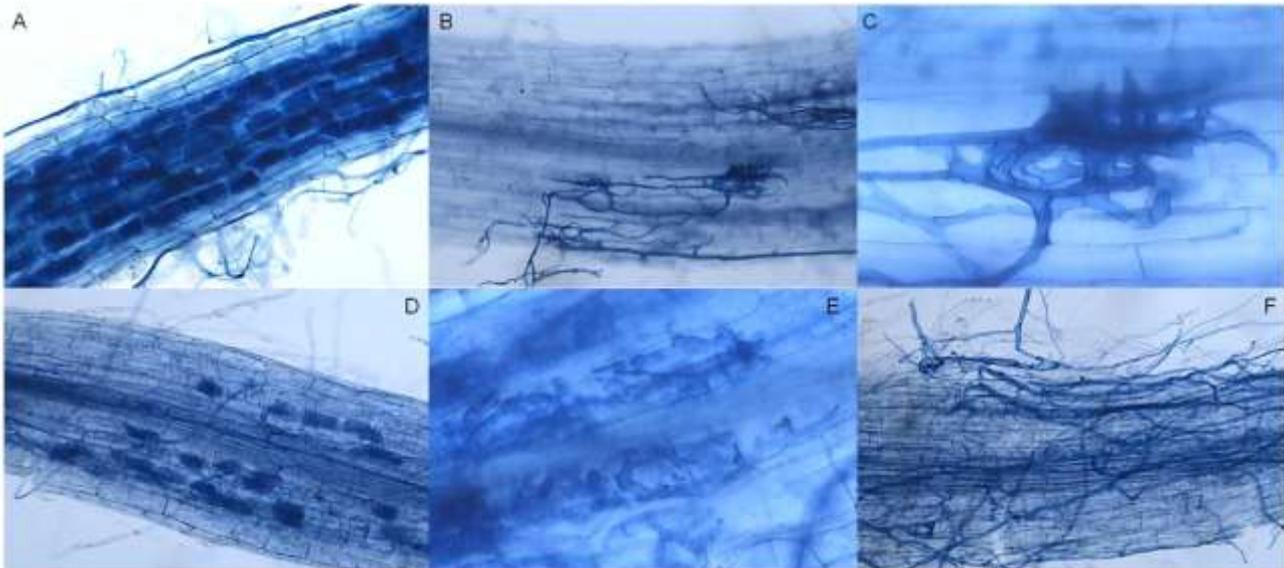


Figura 2 – Alterações morfológicas em raízes de genótipos de tomateiro inoculado com *Glomus clarum*. A - Micro-Tom; B e C - Mutante *epinastic*; D, E e F - Mutante *sitiens*.

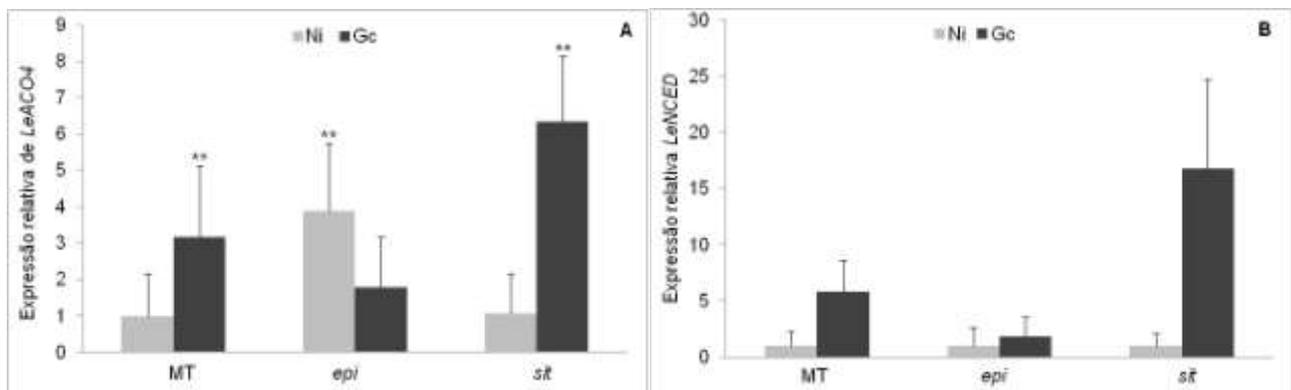


Figura 3 – Acúmulo diferencial de transcritos de ACC oxidase (*LeACO4*) (A) e 9-cis-epoxycarotenóide dioxigenase (*LeNCED*) (B) em raízes de tomateiro cv Micro-Tom (MT) e mutantes *epinastic* (*epi*) e *sitiens* (*sit*) colonizados por *Glomus clarum* (Gc). Os valores são médias de 3 repetições biológicas e de 3 repetições de reações do qRT-PCR. As barras representam o desvio padrão da média. Os valores foram normalizados pelos níveis de transcritos do gene rRNA 18S. Ni, não-inoculado. (**) indica indução significativa ($p < 0,05$) em relação ao MT não-inoculado.