

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**GUSTAVO HENRIQUE RECCHIA**

**Análise da expressão gênica diferencial causada pela interação de feijoeiros  
(*Phaseolus vulgaris* L.) e fungos micorrízicos arbusculares sob efeito de  
déficit hídrico**

**Piracicaba**

**2015**



**GUSTAVO HENRIQUE RECCHIA**

**Análise da expressão gênica diferencial causada pela interação de feijoeiros  
(*Phaseolus vulgaris* L.) e fungos micorrízicos arbusculares sob efeito de  
déficit hídrico**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura da Universidade de São Paulo para  
a obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e  
no Ambiente**

**Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai**

**Piracicaba**

**2015**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Recchia, Gustavo Henrique

Análise da expressão gênica diferencial causada pela interação de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) e fungos micorrízicos arbusculares sob efeito de déficit hídrico / Gustavo Henrique Recchia; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba, 2015.

195 p.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Bioinformática 2. Genômica 3. Micorriza 4. Microscopia 5. Mutualismo (Biologia) 6. Rizosfera 7. RNA 8. Seca 9. Transcrição gênica I. Título

CDU 575.111/112 : 633.35

*Aos meus pais, Geni e Antonio Recchia,  
Por jamais duvidarem do meu potencial,  
Pelo apoio irrestrito,  
Pelo amor e respeito dedicados.  
Vocês fizeram dos meus sonhos os seus próprios  
E agora mais uma etapa se conclui em nossa jornada.  
Sempre certos de que o segredo para superar qualquer obstáculo,  
É e sempre será nossa união.*



## AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento a Prof. Siu Mui Tsai. Sua inteligência e brilhantismo, realçada por sua dedicação e humildade, me deixam orgulhoso por ter feito parte de minha história. Obrigado por mais uma vez ter depositado sua confiança em mim e no meu potencial, pelo respeito, pelos ensinamentos, pelos conselhos e pelas oportunidades valiosíssimas que me foram ofertadas em todos esses anos de convivência e trabalho conjunto.

Aos meus amigos, Enéas Ricardo Konzen e Fernanda Cassieri. Serei eternamente grato por todos momentos de companheirismo. Por todos os dias quentes de Piracicaba, os finais de semana, as noites que vocês despenderam para me ajudar a completar minhas tarefas, sempre com um grande sorriso no rosto, muita paciência e muita disposição. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao apoio financeiro mais uma vez oferecido pela FAPESP (2011-12485-3). Por mais um projeto concluído com êxito que só foi possível graças a esta inestimável parceria.

Ao saudoso Chiquinho (*in memoriam*), cujas anotações e ensinamentos valorosos tornaram possíveis os meus estudos com os fungos micorrízicos. Aos demais técnicos do BIOMOL/CENA, Fabio Duarte e Wagner Peccinini, por sempre serem prestativos e contribuírem para a organização do nosso ambiente de trabalho. A Ludmila Campos, uma amiga sempre prestativa e zelosa que me ajudou a resolver questões vitais para a realização desse projeto.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP), ao Prof. Fernando Andreote e a Denise de L. C. Mescolotti que gentilmente disponibilizaram seus ensinamentos e os inóculos de FMA utilizados nessa pesquisa. Ao Laboratório de Biotecnologia Animal, ao Prof. Luiz Lehmann Coutinho e a Dra. Sonia Andrade que nos auxiliaram em nossas análises iniciais de bioinformática.

À Prof. Adriana Pinheiro Martinelli e a Mônica Lanzoni Rossi (CENA/USP), ao Prof. Ricardo de Della Coletta, e aos colegas Carolina Carneiro e Marcondes Sena (FOP/UNICAMP) pelo apoio imprescindível que me ofereceram para a realização de minhas análises de microscopia.

Ao Prof. Vitor Vitorello e a Mariana Belotti pelo apoio com as análises de Casa de Vegetação utilizando IRGA.

Aos meus colegas do BIOMOL/CENA, Danielle Caldas, Ana Carolina Zakir, Jonathas Graças, Lucas Palma, Marina Dellias, Beatriz Ferrari, Fabiana Canavan, Acácio Navarrete, Lucas Mendes, Rosineide Souza, Naissa Silvestre, Caio Yoshiura, Andressa Venturini, Marília Hauck, Fernanda Nakamura, Aline França, Clóvis Borges e Juliane Ishida pelo companheirismo e amizade nesses anos de convivência.

À Divisão Acadêmica do Cena, em especial Neuda Fernandes, Fabio Oliveira, Daiane Alves e Sonia Campos e a Seção Técnica de Biblioteca, em especial a Marília Ribeiro Garcia Henyei, por todo o apoio e suporte acadêmico na preparação dessa tese.

Às valiosíssimas amizades e laços de companheirismo que estabeleci nestes anos morando em Piracicaba. Aline Borges, Viviane Piccin, Larissa Spoladore e Sheila Carvalho, vocês estarão para sempre na minha memória e coração.

Às minhas tias Sonia Negri e Cacilda Recchia, meus primos Felipe e Mariana Negri, e a Cleberson Forte, por todo o carinho, atenção e cuidados dedicados a mim e a minha mãe nos últimos anos.

À minha mãe e meu pai (*in memoriam*) por acreditarem em meus sonhos e permitirem que eles sejam realizados.

## RESUMO

RECCHIA, G.H. **Análise da expressão gênica diferencial causada pela interação de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) e fungos micorrízicos arbusculares sob efeito de déficit hídrico.** 2015. 195 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A seca é um dos principais problemas que afetam a produção do feijoeiro. Apesar da importância de caracteres fenotípicos radiculares, muitos dos esforços de melhoramento genético da cultura tem focado na seleção de cultivares com maior produção de grãos. A simbiose estabelecida entre plantas e FMA aumentam o potencial de captação de água no solo através das extensas redes formadas pelas hifas e alteram vias metabólicas vitais para a manutenção das relações hídricas da planta. O modelo de interação feijoeiro (BAT 477) colonizado por uma mistura de FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*) foi submetido a um déficit hídrico de 96 h durante o pré-florescimento. O transcrito global de raízes inoculadas e não-inoculadas, sujeitas ou não à seca, foi comparado por RNA-Seq. Um conjunto de 71 transcritos foram induzidos por FMA durante a seca. Comparando-se os tratamentos estresse e controle, 12.086 unigenes foram regulados em plantas inoculadas e 11.938 em não-inoculadas, refletindo o alto potencial de tolerância da linhagem BAT 477 e indicando que a presença de FMA produz uma regulação fina no perfil de expressão de genes regularmente envolvidos na resposta da planta ao estresse. Foram selecionados 15 fatores de transcrição e seus perfis de expressão foram caracterizados por RT-qPCR tomando-se três períodos, 48, 72 e 96 h de déficit hídrico. Plantas inoculadas ativaram a expressão destes genes mais tardiamente (após 72 h), refletindo melhorias nas condições hídricas da planta que adiam a percepção do estresse. Adicionalmente, a expressão de 23 transcritos foi avaliada em três amostras teciduais diferentes obtidas por microscopia de microdissecção a laser. *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* e *PIP2,3*, foram detectados somente em células do córtex radicular contendo arbúsculos indicando uma possível indução tecido específica dependente da presença dos fungos. Análises complementares apontaram a regulação de 171 unigenes envolvidos na resposta das FMA ao estresse. Estes resultados validam a hipótese inicial de que a inoculação com FMA altera os perfis de expressão de genes vitais para a resposta da planta ao déficit hídrico.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Fungos micorrízicos arbusculares. Seca. Transcritoma.



## ABSTRACT

RECCHIA, G.H. **Differential gene expression analysis induced by the interaction between common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and arbuscular mycorrhizal fungi under drought** 2015. 195 p. Thesis (Doctorate) – Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of Sao Paulo, Piracicaba, 2015.

Drought is one of the main problems that affect common bean's production. Despite the importance of root fenological characters, breeding efforts for the culture have focused on the selection of cultivars for grain yield. The symbiosis established between AMF and plants enhances the potential of water absorption from the soil through an extensive net formed by hyphae and alters vital metabolic pathways involved in the maintenance of the water relations in plants. The interaction model common bean (BAT 477) colonized by a mixture of AMF (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* and *Gigaspora rosea*) was exposed to a water deficit regime of 96 h during pre-flowering. Global transcriptome from inoculated and non-inoculated roots, exposed or not to drought, were compared through RNA-Seq. A set of 71 transcripts was induced by AMF during drought. Comparing both stress and control treatments, 12,086 unigenes were regulated in inoculated plants, and 11,938 in non-inoculated, reflecting the great tolerance potential of the lineage BAT 477 and indicating that the presence of AMF produces a fine tune regulation on the expression of genes regularly involved on the drought response of the plant. It was selected 15 transcription factors and their expression profiles were characterized through RT-qPCR taking 3 periods, 48, 72 and 96 h of water deficit. AM plants activated earlier (after 72 h) the expression of these genes, reflecting improvements on the water conditions of the plant that delay the stress perception. Additionally, the expression of 23 transcripts was evaluated on three different tissue samples obtained through laser microdissection microscopy. *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* and *PIP2,3*, were detected only in cortical cells containing arbuscules, pointing to a possible tissue specific induction dependent of the presence of the fungus. Additional analysis point to the regulation of 171 unigenes involved on the response of the AMF to drought. These results corroborate the initial hypothesis that the inoculation with AMF alters the gene expression profiles of genes that are vital for water deficit response in plants.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Drought. Transcriptome.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Hipótese e Objetivos .....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 O Feijoeiro ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	21
2.2 Impacto do déficit hídrico sobre a cultura do feijoeiro .....	22
2.3 Mecanismos de tolerância à seca em feijoeiro .....	24
2.4 Interação Simbiótica com Fungos Micorrízicos Arbusculares.....	27
2.5 O papel das FMA na tolerância à seca em plantas .....	30
2.6 Alterações bioquímicas e metabólicas em plantas inoculadas por FMA .....	34
REFERÊNCIAS .....	39
3 INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO POR FMA SOBRE OS PADRÕES DE CRESCIMENTO RADICULAR E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO SUBMETIDOS A DÉFICIT HÍDRICO .....	50
Resumo.....	50
Abstract .....	51
3.1 Introdução .....	52
3.2 Material e Métodos.....	54
3.2.1 Desenho experimental e ensaio de déficit hídrico.....	54
3.2.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas.....	56
3.2.3 Taxa de colonização das plantas por FMA .....	58
3.3 Resultados e Discussão .....	58
3.3.1 Taxa de colonização das plantas de feijoeiro por FMA .....	58
3.3.2 Parâmetros de crescimento.....	60
3.3.3 Relações hídricas da folha.....	66
3.3.4 Parâmetros Fisiológicos da Planta.....	66
3.3.5 Análise multivariada canônica .....	75
3.4 Conclusões .....	76
Referências .....	77
4 ANÁLISE TEMPORAL DE GENES RESPONSIVOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM GENÓTIPO TOLERANTE (BAT477) INOCULADO COM FMA .....	81
Resumo.....	81
Abstract .....	82
4.1 Introdução .....	83
4.2 Material e Métodos.....	85

4.2.1 Desenho experimental e ensaio de déficit hídrico .....	85
4.2.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas .....	85
4.2.3 Taxa de colonização das plantas por FMA.....	86
4.2.4 Identificação e caracterização genômica da família de genes <i>NAC</i> (NAM/ATAF1/CUC) em feijoeiro .....	86
4.2.5 Desenho de primers para a análise de RT-qPCR.....	87
4.2.6 Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	89
4.3 Resultados e Discussão.....	90
4.3.1 Identificação de genes <i>NAC</i> em feijoeiro .....	90
4.3.2 Parâmetros fisiológicos e de crescimento das plantas .....	94
4.3.3 Análise temporal de expressão gênica de genes <i>NAC</i> em feijoeiro.....	96
4.4 Conclusões.....	102
Referências .....	102
<b>5 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO SISTEMA MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO (BAT477) – FMA (<i>Glomus clarum</i>, <i>Acaulospora scrobiculata</i>, <i>Gigaspora rosea</i>) SOB DÉFICIT HÍDRICO .....</b>	<b>108</b>
Resumo .....	108
Abstract .....	109
5.1 Introdução.....	110
5.2 Material e métodos .....	111
5.2.1 Desenho experimental/ Ensaio de déficit hídrico/ Taxa de colonização das plantas por FMA..	111
5.2.2 Extração de RNA total e preparo das bibliotecas de cDNA para RNA-Seq .....	112
5.2.3 Pipeline para as análises de bioinformática .....	113
5.3 Resultados e Discussão.....	115
5.3.1 Quantificação e qualidade das amostras de RNA-total, pré-processamento e montagem das sequências.....	115
5.3.2 Análise de expressão gênica diferencial .....	115
5.3.3 Classificação funcional das bibliotecas de RNA-Seq.....	128
5.3.4 Genes regulados diferencialmente durante a interação de BAT 477 com FMA sob o efeito de déficit hídrico.....	132
5.5 Conclusões.....	137
Referências .....	138
<b>6 ANÁLISE DOS PADRÕES CELULARES ESPECÍFICOS DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA À SECA NO MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO (BAT477) – FMA.....</b>	<b>143</b>
Resumo .....	143
Abstract .....	144
6. Introdução.....	145

6.2 Material e métodos .....	146
6.2.1 Desenho experimental/ ensaio de déficit hídrico/ taxa de colonização por FMA .....	146
6.2.2 Coleta e preparo das amostras para visualização por microscopia de campo claro .....	146
6.2.3 Coleta e preparo das amostras para análises de microdissecção a laser por microscopia no sistema Leica LMD (Leica Microsystems®) .....	147
6.2.4 Extração de RNA total das amostras microdissecadas.....	148
6.2.5 Desenho de primers para as análises de RT-PCR e RT-qPCR.....	149
6.2.6 Análise semi-quantitativa por RT-PCR.....	151
6.2.7 Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	151
6.2.8 Controle endógeno .....	152
6.3 Resultados e Discussão .....	152
6.3.1 Análise de microscopia em campo claro.....	152
6.3.2 Microdissecção a laser por microscopia e extração de RNA-total.....	153
6.3.3 Análise semi-quantitativa por densitometria em gel de agarose dos produtos de RT-PCR .....	158
6.3.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR .....	161
6.4 Conclusões .....	164
Referências .....	164
<b>7 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO SISTEMA MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO – FMA REVELAM ALTERAÇÕES NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS FUNGOS DURANTE A OCORRÊNCIA DE DÉFICIT HÍDRICO.....</b>	<b>167</b>
Resumo.....	167
Abstract .....	168
7.1 Introdução .....	169
7.2 Material e Métodos.....	170
7.2.1 Pipeline empregado nas análises de bioinformática.....	170
7.3 Resultados e Discussão .....	172
7.3.1 Quantificação e qualidade das amostras de RNA-total, pré-processamento e análise das sequências .....	172
7.3.2 Análise de expressão gênica diferencial dos dados de RNA-Seq .....	172
7.4 Conclusões .....	183
Referências .....	183
8. Conclusões Gerais.....	186
ANEXOS.....	187



## 1. INTRODUÇÃO

Alterações climáticas a longo prazo têm conduzido para um aumento nas ocorrências de episódios de seca em diferentes regiões do planeta (WATSON, 2001; PARRY et al., 2007). Este fato, aliado à expansão da produção agrícola para áreas marginais, possuem o potencial de gerar um grande número de ambientes instáveis para a produção, gerando insegurança no suprimento alimentar em escalas local e global (WATSON, 2001; PARRY et al., 2007). A seca é considerada um dos principais fatores ambientais que afetam a agricultura, agravada pelo crescimento populacional e consequentemente pelo aumento na demanda por alimentos, especialmente em países em desenvolvimento (JONES, 1999).

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a segunda cultura do grupo das leguminosas mais importantes em todo o planeta (SINGH; MUÑOZ, 1999). A produção do feijoeiro é realizada em uma ampla gama de sistemas agrícolas e ambientes, sendo a América Latina a principal produtora e consumidora, onde o feijão é uma significativa e tradicional fonte alimentar, especialmente no Brasil, México, nas regiões dos Andes, América Central e no Caribe (JONES, 1999). Como uma excelente fonte proteica, de ácido fólico, fibras e carboidratos complexos, o feijão é considerado de alto valor nutricional (JONES, 1999). Configura-se também como uma excelente fonte de ferro, em alternativa à carne, suprimindo de 23-30% dos níveis diários requeridos na dieta de adultos (JONES, 1999).

Na América Latina, África e Ásia, o feijoeiro é essencialmente uma cultura de pequena escala, mantida com baixos níveis de insumos e submetida a uma grande quantidade de problemas biológicos, edáficos e climáticos (SHWARTZ; PASTOR-CORRALES, 1989; JONES, 1999). As condições sob as quais esta cultura é mantida nessas regiões são extremamente variáveis (JONES, 1999), e tais fatores aliados a padrões locais de preferência altamente específicos por características das sementes (tamanho, formato, coloração) têm dificultado o estabelecimento de novas estratégias de melhoramento para a cultura.

A produção do feijoeiro nessas regiões é bastante reduzida, frequentemente empregando pouca ou nenhuma técnica mecanizada de irrigação (JONES, 1999). O feijoeiro é cultivado principalmente em áreas sujeitas à seca, e longos períodos de exposição a esta fonte ambiental de estresse parecem ser um problema global endêmico afetando a maioria das áreas produtoras (SHWARTZ; PASTOR-CORRALES, 1989). O feijoeiro é particularmente suscetível à seca durante os estágios de florescimento e enchimento dos grãos (R5 e R8, respectivamente) (FERNÁNDEZ; GEPTS; LÓPEZ, 1986; FAGERIA; BALIGAR; JONES, 2010). Níveis moderados de déficit hídrico usualmente conduzem para uma redução na biomassa da planta e

na baixa quantidade de sementes por vagem, precocidade na maturação, diminuição no peso das sementes e queda nas taxas de fixação de nitrogênio (RAMIREZ-VALLEJO; KELLY, 1998).

Como organismos sésseis, as plantas desenvolveram mecanismos específicos de aclimação e adaptação para responder e sobreviver a períodos variados de déficit hídrico (HARB et al., 2010). A análise destes mecanismos de proteção vem a contribuir de maneira significativa para a nossa compreensão dos mecanismos de tolerância e resistência ao estresse. A resposta da planta à seca pode ser influenciada por diferentes fatores, dependendo principalmente da severidade do evento, o que inclui a extensão do período de déficit hídrico, e se a planta já foi exposta a um regime prévio de aclimação a esta condição (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). A resposta à seca resulta de uma série de eventos integrados que compreendem desde a percepção do estresse pela planta, a transdução de sinais, a regulação da expressão de genes específicos, e as consequentes alterações a nível metabólico (DEEBA et al., 2012).

É amplamente reconhecido que a composição da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no solo pode influenciar a performance da planta (GRÜMBERG; URCELAY, 2015). FMA são membros do filo Glomeromycota e, com poucas exceções, são ubíquos a todos os ecossistemas terrestres de solo nos quais colonizam os sistemas radiculares de cerca de 80% das espécies de plantas conhecidas, incluindo culturas agrícolas (SANDERS; CROLL, 2010). Como tem sido demonstrado numa série estudos ecofisiológicos envolvendo sistemas planta (hospedeiro) – fungo, a relação simbiótica mutualística estabelecida entre FMA e o sistema radicular das plantas é um componente importante no auxílio das plantas na tolerância à seca (AUGÉ, 2001; RUIZ-LOZANO, 2003). Nas plantas, a atenuação dos sintomas provocados pelo déficit hídrico durante a simbiose com FMA é amparada nos efeitos positivos advindos da presença do fungo que potencializa a absorção e transporte de água e nutrientes, especialmente o fósforo disponível (Pi) e outros nutrientes imóveis, a partir de reservas inacessíveis à planta no solo, resultando numa maior hidratação da planta, em uma fisiologia sustentável e na promoção do crescimento (AUGÉ, 2001; RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014).

As bases moleculares para tal tolerância à seca estão ainda distantes de serem elucidadas. Acredita-se que a interação com FMA ocasione nas plantas mudanças locais e globais nos perfis de expressão de genes cujos produtos são críticos durante a resposta metabólica da planta ao estresse (PORCEL; AROCA; RUIZ-LOZANO, 2012). O crescente aumento no número de trabalhos relatando o papel benéfico dos microrganismos e as respostas fisiológicas desencadeadas nas plantas hospedeiras sugerem uma ação combinada de fatores

ambientais e biológicos. Maiores esforços se fazem necessários a fim de se obter uma maior clareza na multifacetada pesquisa relacionada à intercomunicação entre grupos tão distintos, como ocorre a regulação da composição de espécies, como isso afeta os ciclos biogeoquímicos e o ecossistema onde estão inseridos e como pode ser aplicado na agricultura visando uma maior produção de alimentos e combustíveis (CHAKRABORTY; PANGGA; ROPER, 2012).

No presente trabalho, o sistema modelo de interação feijoeiro (c.v. BAT477, tolerante a déficit hídrico) – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora rosea*) foi adotado com o objetivo de explorar os mecanismos moleculares de expressão gênica envolvidos na tolerância à seca incrementada pela presença dos fungos. O genótipo de feijoeiro BAT477, considerado como tolerante a seca foi selecionado principalmente devido ao seu histórico de seleção e melhoramento genético em solos com baixa disponibilidade de fósforo e déficit hídrico (LYNCH; WHITE, 1992; TANG et al., 2004; JEBARA et al., 2005; BEEBE et al., 2013). BAT 477 se mostrou também bastante eficiente para o estabelecimento da simbiose com FMA (TAJINI et al., 2009).

Em condições de casa de vegetação, um modelo de experimentação foi estabelecido no intuito de se definir o estágio de desenvolvimento das plantas de feijoeiro em que estas estavam ao mesmo tempo mais responsivas ao déficit hídrico e à simbiose com os FMA. Coletas de tecidos radiculares e foliares foram realizadas ao longo do período de estresse, a partir de amostras inoculadas e não-inoculadas por FMA. Por meio de RT-qPCR, o perfil de expressão gênica de transcritos específicos foi analisado. Estes genes foram selecionados a partir de uma biblioteca subtrativa por supressão de hibridização de cDNA obtida em estudo prévio (RECCHIA et al., 2013), entre aquaporinas e fatores de transcrição. Selecionado o modelo ideal de experimentação (estágio de pré-florescimento R5, decorridos 40-42 dias do plantio e inoculação com FMA e 92 horas de déficit hídrico), um transcrito global foi realizado pela técnica de RNA-Seq envolvendo amostras de raízes inoculadas e não-inoculadas por FMA. A análise de RNA-Seq permitiu a identificação de alterações nos perfis de expressão de grupos gênicos específicos associados à tolerância a déficit hídrico em feijoeiro, contrastando a influência da presença de FMA. Além disso, foi possível observar mudanças significativas no perfil de expressão gênica dos FMA envolvidos no modelo de interação estudado durante a ocorrência do estresse. Transcritos especificamente associados à resposta à seca sob influência de FMA foram então selecionados e seus perfis de expressão gênica foram explorados por meio de RT-qPCR tomando-se como base o RNA total extraído a partir de tipos celulares específicos selecionados em raízes a partir de microscopia por dissecação a laser. Este experimento foi importante para corroborar hipóteses iniciais de que determinados genes são expressos

unicamente em células colonizadas por FMA durante o estresse. Por fim, o modelo de experimentação estabelecido em casa de vegetação foi testado para os outros genótipos de feijoeiro contrastantes quanto ao potencial de tolerância a déficit hídrico (IAC-Carioca 80SH, Rosinha G2, G 12478, SEA-5 e G40111, este último um genótipo de *Phaseolus acutifolius*, espécie aparentada a *P. vulgaris* e especialmente adaptada a regiões secas), sendo que parâmetros fisiológicos e de crescimento foram analisados.

## 1.1 Hipótese e Objetivos

Este estudo tem como hipótese central que a associação simbiótica estabelecida entre o feijoeiro e Fungos Micorrízicos Arbusculares durante o déficit hídrico conduz ao estabelecimento de perfis diferenciados de expressão gênica nas raízes do hospedeiro que condicionam para um padrão melhorado de resposta ao estresse. Além disso, tais genes seriam regulados de forma distinta de acordo com o tipo celular analisado e o período de progressão do estresse.

O sistema modelo de interação feijoeiro (c.v. BAT477, tolerante a déficit hídrico) – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora rosea*) foi adotado com o objetivo de explorar os mecanismos moleculares de expressão gênica envolvidos na tolerância à seca incrementada pela presença dos fungos. Para tal finalidade foram conduzidos cinco estudos que serão apresentados na forma de capítulo, cada um, a seguir:

- Estudo 1: Influência da inoculação por FMA sobre os padrões de crescimento radicular e respostas fisiológicas de genótipos de feijoeiro submetidos a déficit hídrico. Seis genótipos de feijoeiro contrastantes quanto à tolerância a déficit hídrico e ao potencial de colonização por FMA foram selecionados: BAT 477, IAC-Carioca 80SH, Rosinha G2, G 12873, SEA-5 e G40111. Foi estabelecido um experimento em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura e irrigação, visando manter a saturação do substrato em níveis similares ao da capacidade de campo do substrato (80%). O déficit hídrico foi aplicado durante o estágio de R5 de forma gradual ao longo de 15 dias. Foram coletados dados referentes a crescimento radicular, massa seca de raízes e folhas, conteúdo relativo de água das folhas e feitas medições de trocas gasosas e assimilação fotossintética utilizando IRGA LI-6400X.
- Estudo 2: Análise temporal de genes responsivos ao déficit hídrico em genótipo tolerante (BAT477) inoculado com FMA. A fim de se determinar o período em

que o sistema modelo de interação feijoeiro (c.v. BAT477) – FMA encontrava-se mais responsivo ao déficit hídrico, foram selecionados genes marcadores para a resposta de feijoeiro à seca dentre aqueles pertencentes à família de fatores de transcrição NAC. Seus perfis de expressão foram analisados por meio de RT-qPCR a partir de RNA total extraídos de raízes de feijoeiro, colonizadas ou não por FMA, ao longo de três períodos após o corte da irrigação: 48, 72 e 96 horas.

- Estudo 3: Análise transcritômica do sistema modelo de interação feijoeiro (c.v. BAT477) – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora rosea*) sob déficit hídrico. RNA total foi extraído de raízes de feijoeiro, colonizadas ou não por FMA, após 96 horas de corte de irrigação e controle irrigado. Bibliotecas de cDNA foram preparadas e sequenciadas pela técnica de RNA-Seq (plataforma HiScan System - Illumina®). Os transcritomas foram trimados quanto a qualidade do sequenciamento, mapeados e anotados em relação ao transcritoma de referência (SHMUTZ et al., 2014). Processada a contagem dos *reads* para cada gene anotado em cada replicada, a normalização dos dados em cada tratamento foi efetuada e os perfis de expressão foram comparados afim de se selecionar os genes com maiores diferenças de expressão (induzidos e reprimidos) para cada condição analisada.
- Estudo 4: Análise de padrões celulares específicos de expressão de genes envolvidos na tolerância à seca no modelo de interação feijoeiro (c.v. BAT477) – FMA. Com o auxílio da técnica de microscopia de microdissecção a laser (Leica® LMD 7000), células de córtex radicular de plantas sob déficit hídrico contendo arbúsculos foram selecionadas e separadas de tecido epidérmico. RNA total foi extraído a partir destes dois tipos celulares, além de células de córtex radicular de plantas não micorrizadas. Transcritos selecionados como mais significativamente regulados, entre induzidos e reprimidos, nas análises de expressão diferencial de RNA-Seq foram analisados por meio de RT-qPCR e densitometria em gel de agarose com o intuito de diferenciar processos localizados de regulação de expressão genica de eventos de sinalização.
- Estudo 5: Análise transcriptômica do sistema modelo de interação feijoeiro – FMA revelaram alterações nos perfis de expressão gênica dos parceiros fungos durante a ocorrência de déficit hídrico. O genoma de referência de *Rhizophagus irregularis* (TISSERANT et al., 2013) foi utilizado para o mapeamento das amostras de sequenciamento de RNA-Seq obtidas no Estudo 3 revelando valores

médios de identidade com 5 – 10% dos *reads* amostrados em cada transcrito de planta inoculada. Processada a contagem dos *reads* para cada gene anotado em cada replicada, a normalização dos dados em cada tratamento foi efetuada e os perfis de expressão foram comparados afim de se selecionar os genes com maiores diferenças de expressão (induzidos e reprimidos) durante o estresse.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro (*P. vulgaris* L.) é um membro da família Fabaceae, subfamília Faboideae. Inicialmente uma cultura característica da América Latina, o feijoeiro é agora cultivado extensivamente em praticamente todos os continentes do mundo (GRAHAM; RANALLI, 1997). Sua produção se espalha desde 52°N até 32°S de latitude (van SCHOONHOVEN; YOVEST, 1991), e de regiões litorâneas nos EUA e Europa até elevações de mais de 3000 m nos Andes, na América do Sul. Consiste na principal fonte proteica na dieta de populações que ocupam a América Latina e a região Leste da África (BEEBE et al., 2009).

Trata-se de uma cultura agrícola bastante importante, nativa das Américas, e se tornou a leguminosa mais amplamente empregada em consumo humano direto (BROUGHTON et al., 2003). A espécie é um diploide ( $n=11$ ), com um rápido ciclo de crescimento (~60-120 dias) e um genoma pequeno (650 Mb) que vem sendo empregado em diversos estudos de fixação de nitrogênio, adaptação a solos com baixa fertilidade e qualidade nutricional (BLAIR et al., 2013). A estrutura genômica do feijoeiro serve como um modelo para a estrutura genômica mais complicada da soja (GALEANO et al., 2009; MCCONNELL et al., 2010) e deve estar bastante próximo ao genoma do feijão de corda e de outras espécies tropicais de leguminosas. As taxas de polimorfismo em feijoeiro são altas devidos aos dois pools gênicos separados (Andino e Mesoamericano) sendo uma cultura baseada em múltiplos centros de origem e diversidade (GEPTS et al., 2008). Desta forma, seus recursos genéticos se caracterizam por um complexo arranjo de pequenos a grandes reservatórios genéticos, raças e tipos intermediários, com uma ocasional introgressão entre tipos domesticados e selvagens (BROUGHTON et al., 2003).

As taxas de produtividade do feijoeiro são baixas, mesmo para os padrões das leguminosas, e a qualidade proteica é frequentemente sub-ótima. Tal fator pode ser atribuído provavelmente a um extenso histórico de seleção que priorizou a estabilidade da cultura em detrimento da qualidade da produção (BROUGHTON et al., 2003). A América Latina é a região de maior produtividade, representando cerca de 50% do volume mundial total, seguido pela África com 25%, sendo que Brasil, México e Estados Unidos são os três maiores países produtores no hemisfério ocidental (BEEBE et al., 2013).

Considerando-se a diversidade fisiográfica do Brasil e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, é possível explorar a cultura em três épocas diferentes no mesmo ano. A safra "das águas", cujo plantio é feito de agosto a novembro, com predominância na Região Sul; o plantio "da seca", realizado de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores; e "de inverno", de abril a julho, realizado nas Regiões Centro-Oeste e Sudeste e realizada basicamente pelo processo de irrigação (STONE; SARTORATO, 1994). Somando-se as três safras para as temporadas 2014/15 é estimado que a área total de feijoeiro plantada no Brasil seja de 3.049 milhões de hectares, cerca de 9,4% menor que a safra passada (2013/14), fato correlacionado a intensa queda na produção do feijão de segunda safra ocasionada pelo excesso de chuvas, ataques de mosca-branca e abandono da prática pelos agricultores em detrimento dos elevados custos de produção e baixa rentabilidade. A produção nacional de feijão deverá alcançar 3.166,3 milhões de toneladas, 8,3% menor que a última safra (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2015).

## 2.2 Impacto do déficit hídrico sobre a cultura do feijoeiro

O déficit hídrico em plantas se refere a insuficiência na disponibilidade de água, incluindo precipitação e capacidade de umidade do solo, disponíveis em quantidades adequadas e distribuídas durante o ciclo completo de desenvolvimento da planta e com potencial para a restrição da expressão do potencial genético total do cultivar (BEEBE et al., 2013). O déficit hídrico terminal ou mesmo intermitente afeta cerca de 60% da produção total de feijão em todo o planeta (WHITE; SINGH, 1991). Essa cultura requer entre 200 e 400 mm de água durante seu crescimento e desenvolvimento, mas estima-se que mais de 73% do total da produção na América Latina e 40% do total na África ocorram sob condições microclimáticas que apresentam de moderado a severo déficit hídrico em algum momento durante seu cultivo (BROUGHTON et al., 2003). As regiões produtoras mais afetadas pela seca na América Latina são o Nordeste brasileiro e as regiões Central e Norte do México (BEEBE et al., 2013).

Práticas de melhoramento genético tradicional para a aquisição de tolerância à seca na cultura possuem um longo histórico no México, Honduras e Brasil, além do *Centro Internacional de Agricultura Tropical* (CIAT) na Colômbia. Entretanto, a diversidade de condições sobre as quais o feijoeiro é cultivado, aliado às preferências locais bastante altas por tipos específicos de grãos, tem complicado as tentativas de melhoramento genético da cultura. Como resultado, apesar de grandes avanços em cruzamentos para a resolução de problemas relacionados a estresses abióticos como a seca, além de doenças, insetos e conteúdo nutricional,

pouco vem sendo alcançado no sentido de aumentar os números de produção (GRAHAN; RANALLI, 1997).

O déficit hídrico afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e raiz das plantas, causando redução na expansão celular, condutância estomática, fotossíntese e, conseqüentemente, no acúmulo de matéria seca (HSIAO, 1990). Muitos estudos vêm sendo conduzidos no sentido de aumentar o desempenho do feijoeiro sob déficit hídrico (SHNEIDER; BROTHERS; KELLY, 1997). Sob déficit hídrico severo o feijoeiro passará a ficar sujeito à redução na mobilização de nitrogênio, diminuição no percentual de produção e na eficiência quanto ao uso da água disponível. Segundo Shneider, Brothers e Kelly (1997), variações em genes que condicionam para o movimento do ângulo foliar, alteração esta citada como um mecanismo de tolerância à seca foi relatado em genótipos de origem Andina. Variações genéticas que condicionam para o estiolamento parecem ter menos importância para a tolerância do que aquelas para o enraizamento. Outro fator que contribui para um aumento no desempenho do feijoeiro sob déficit hídrico é a plasticidade fenotípica, característica essa que permite aos genótipos reduzirem drasticamente seus ciclos de desenvolvimento, fator este útil para adiar datas de plantio e assim evitar épocas de seca (SHNEIDER; BROTHERS; KELLY, 1997).

A maior parte dos estudos na área tem concentrado esforços na avaliação de bancos de germoplasma. Withe et al. (1994) conduziram estudos genéticos em materiais parentais do CIAT e México e encontraram evidências de que a capacidade de combinação de caracteres de tolerância foi determinada em grande parte pela adaptação local. Dois diferentes conjuntos de germoplasma foram testados sob as condições típicas de precipitação encontradas no Norte do México que variam de chuvas erráticas a insuficientes, sendo o principal caractere avaliado a produção de sementes. O conjunto principal consistiu de 7000 acessos oriundos do *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias* (INIFAP), cultivados em três subgrupos ao longo de três anos em duas localizações. Neste estudo, genótipos resistentes à seca foram identificados principalmente entre as raças Durango e Mesoamericana, enquanto que genótipos da raça Jalisco foram indicadas como suscetíveis. O segundo conjunto incluiu 800 genótipos da coleção mundial de germoplasma reunida no CIAT (TOHME et al., 1995). Após dois anos de análises, um conjunto de 20 genótipos, a maior parte pertencentes à raça Durango originária do México, foram identificados como resistentes à seca.

Posteriormente, todos os genótipos resistentes, além de cultivares melhorados locais, foram testados ao longo de oito ensaios em três regiões que diferiam em altitudes no México:

altitudes baixas, médias e elevadas (ACOSTA-GALLEGOS et al., 2004). Para as duas primeiras regiões, genótipos localmente adaptados, combinados a algumas linhagens parentais endogâmicas, estavam entre os 25% melhores produtores, como as cultivares melhoradas do CIAT pertencentes à raça Mesoamericana, TLP 19 e SEA 10, além de 97-RS-101 da raça Durango. Nos quatro ensaios envolvendo regiões semi-áridas de elevada altitude, os cultivares superiores incluem o cultivar melhorado Pinto Villa e os genótipos G 13637 (Apetito) e G 842 (PI 201331). Para todas as regiões analisadas os melhores cultivares foram aqueles com hábitos de crescimentos dos tipos II e III e com resistência a doenças. Além disso, cultivares que apresentaram ampla adaptação em todas as regiões apresentavam reação neutra a fotoperíodo. Sob déficit hídrico intermitente e/ou terminal, um particionamento acelerado de fotoassimilados em direção às estruturas reprodutivas pareceu ser o aspecto fundamental para a produtividade de sementes em feijoeiro (ROSALES-SERNA et al., 2004).

Com o advento das técnicas de marcadores moleculares de DNA, uma série de populações de mapeamento foram geradas. Uma lista contendo 14 destas populações foi publicada, incluindo dez linhagens endogâmicas recombinantes (*Recombinant inbred lines – RILs*) (BROUGHTON et al., 2003; BEEBE et al., 2013). O CIAT detém no momento alguns conjuntos de RILs geradas especificamente para estudos relacionados à seca, incluindo outras voltadas para o estudo de arquitetura de raiz e caracteres funcionais envolvidos na nutrição (BLAIR et al., 2012). Uma série de publicações envolvendo raízes e nutrição por fósforo (P) resultaram da população DOR 364 x G 19833 (LIAO et al., 2004; YAN et al., 2004). Esta população provou ser especialmente útil para revelar a relação entre a aquisição de P do solo e caracteres radiculares específicos demonstrando a associação de cada um com regiões genômicas específicas. Esta metodologia pode ser prontamente estendida para traços associados a resistência à seca. Outras populações derivadas de RILs incluem os parentais tolerantes a seca BAT 477, G 21212, ICA Quimbaya e SEA-5.

### **2.3 Mecanismos de tolerância à seca em feijoeiro**

Muitos são os fatores que podem afetar a resposta de uma planta ao déficit hídrico, incluindo a duração da falta de água, o nível de exposição e a possibilidade da planta já ter sido previamente aclimatada a esta condição (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). Tipicamente, os mecanismos de tolerância à seca são agrupados em três categorias: evasão da seca, evitar a seca e tolerar a seca (LEVITT, 1972). A evasão da seca é definida como a habilidade da planta em completar seu ciclo de vida antes que o déficit hídrico do solo, e da

própria planta, se desenvolva, e inclui desenvolvimento fenológico acelerado, plasticidade fenotípica e remobilização de fotoassimilados para os grãos. Evitar a seca compreende a habilidade da planta em manter um alto potencial hídrico nos tecidos apesar da baixa quantidade de água disponível no solo, o que é alcançado com o aumento no crescimento radicular em profundidade, um eficiente sistema radicular e condutância hidráulica, além de redução na perda de água através de redução de condutância na folha, redução na absorção de radiação por alteração de ângulo foliar e redução na evaporação superficial (área foliar). A tolerância à seca é a habilidade da planta de sobreviver ao déficit hídrico através de baixo potencial hídrico nos tecidos mantendo-se o turgor celular através de ajustes osmóticos (acúmulo de solutos nas células), aumento da elasticidade celular e tolerância à dessecação por resistência protoplasmática.

A percepção da seca em plantas conduz inicialmente à redução nas taxas fotossintéticas, e conseqüentemente no crescimento, o que está diretamente associado a alterações nos padrões metabólicos de carbono e nitrogênio (LAWLOR; CORNIC, 2002). A redução da rede fotossintética está associada a uma série de eventos coordenados, tais como o fechamento estomatal e a redução na atividade de enzimas fotossintéticas (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; ARANJUELO et al., 2011). O fechamento estomatal é provavelmente um dos fatores mais importantes que controlam o metabolismo de carbono, mas seu papel está diretamente relacionado à severidade do déficit hídrico, já que frente a estresses mais intensos, a fotossíntese pode ser controlada mais pela capacidade de fixação do CO<sub>2</sub> pelos cloroplastos do que pelo aumento na resistência à difusão (BOTA; MEDRANO; FLEXAS, 2004).

A redução na área foliar é uma das mais importantes adaptações fisiológicas em feijoeiro. Ela é resultado de uma redução no número de folhas, redução no tamanho de folhas jovens e acentuação na perda de folhas por senescência, o que resulta em queda na produção de sementes (BEEBE et al., 2013). Através de triagem em campo, algumas linhagens tolerantes à seca foram selecionadas, tais como BAT 477, A 195 e BAT 1289 (WHITE, 1988; WHITE; SINGH, 1991). O nível superior de adaptação de BAT 477 ao déficit hídrico foi atribuído a capacidade de evitar a seca através de acentuado crescimento radicular e capacidade de extrair umidade do solo em maiores profundidades (SPONCHIADO et al., 1989). Rao et al. (2004), avaliaram 36 linhagens entre parentais e acessos em condições de campo durante duas estações no CIAT, Colômbia. Foram selecionados dois acessos de *P. acutifolius* (G 40159 e G 40068) e dois parentais (RAB 650 e SEA 23) com potencial superior para adaptação a condições de déficit hídrico. Tal potencial superior foi associado com suas

habilidades de mobilização de produtos fotossintetizados para as sementes em desenvolvimento e em utilizar de forma mais eficiente o nitrogênio assimilado para a produção de sementes.

Em nível celular, o déficit hídrico leva ao acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs), cuja produção excessiva pode conduzir também para o estresse oxidativo do aparato fotossintético e prejudicar severamente o funcionamento normal das células (FOYER; NOCTOR, 2009; DIETZ; PFANNSCHMIDT, 2011). Os altos níveis de EROs podem agir nas células como mensageiros secundários envolvidos nas vias de transdução de sinais para a ativação da resposta ao estresse (FOYER; NOCTOR, 2009). Além disso, a capacidade de remoção de EROs e a redução de seus efeitos danosos à célula estão relacionadas à tolerância das plantas ao estresse (FAIZE et al., 2011). Em estudo que visou comparar o perfil transcricional global de raízes de dois genótipos contrastantes em relação à sua capacidade de tolerância a déficit hídrico, BAT 477 (tolerante) e IAC-Carioca 80SH (suscetível), foi identificado que a progressão do período de exposição ao déficit hídrico é acompanhada pelo aumento na taxa de atividade da enzima catalase (CAT), sendo este aumento em média cinco vezes mais intenso no genótipo tolerante (RECCHIA et al., 2013). Além disso, nesse mesmo estudo os autores foram capazes de identificar transcritos relacionados a uma série de enzimas comumente associadas a tarefa de eliminação de EROs tais como: *superoxide dismutase* (SOD), *ascorbate peroxidase* (APX), outras peroxidases e uma thioredoxina peroxidase.

A nível molecular, alguns grupos específicos de genes podem ser submetidos a processos distintos de regulação de expressão gênica (principalmente através de ciclos de indução e repressão da expressão) determinando novos perfis de síntese proteica e dessa forma alterando suas funções biológicas (DEEBA et al., 2012). Uma grande quantidade de genes tem sido implicada, de forma individual e coletiva, na resposta à seca em plantas, mas a identificação de quais seriam mais úteis para a adoção em programas tradicionais de melhoramento genético e em técnicas de transformação genética visando a melhoria da resposta ao estresse ainda permanecem um grande desafio (COHEN et al., 2010).

Programas de melhoramento genético usualmente concentram seus esforços na transferência de um único, ou pequeno conjunto, de genes que possuem o potencial de codificar para vias bioquímicas específicas, ou para produtos finais das vias de transdução de sinais, que usualmente são controlados pela ação constitutiva de promotores (NELSON; SHEN; BOHNERT, 1998). Estes produtos gênicos protegem as plantas contra os danos causados pelo déficit hídrico e são divididos em diferentes classes: osmo-protetores (aminoácidos, compostos dimetil-sulfonil, manitol, sorbitol, carboidratos complexos); removedores de EROs; proteínas LEA; proteínas *Heat-shock*; transportadores de íons; desaturases associadas ao metabolismo de

ácidos graxos; aquaporinas; componentes de sinalização (homólogos a histidina quinases, MAP quinases, proteínas quinase dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , fosfatases, sensores de  $\text{Ca}^{+2}$ , inositol quinases); fatores de transcrição (EREBP/AP2, bZIP, ABRE, NAC, MYB, WRKY); reguladores hormonais de crescimento (ABA, etileno, citocininas, jasmonatos, brassinoesteróides) (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000; NELSON; SHEN; BOHNERT, 1998; HOLMBERG; BÜLOW, 1998; SMIRNOFF, 1998; BOHNERT; SHEVELEVA, 1998).

Uma série de estudos voltados para a elucidação dos perfis transcricionais globais, e de grupos específicos de genes, envolvidos na resposta de feijoeiro ao déficit hídrico vem sendo publicados nos últimos anos. Torres et al. (2006), se valeram da técnica de *differential display RT-qPCR* (DDRT) para identificar 16 clones em *P. vulgaris* relacionados à pré-regulação da resposta em raízes ao déficit hídrico, o que permitiu a identificação de quatro genes envolvidos em eventos de sinalização celular, alterações estruturais em proteínas, translocações, chaperonamento e modulação do crescimento radicular. Bibliotecas de cDNA de tecido radicular de genótipo tolerante a seca de feijão-Tepari (*P. acutifolius* L.) foram utilizadas para identificar potenciais genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico (RODRIGUEZ-URIBE; O'CONNELL, 2006). Um novo fator de transcrição do tipo bZIP foi identificado e demonstrou acumular também em raízes de feijoeiro-comum (*P. vulgaris* L.). Recchia et al. (2013) construíram uma biblioteca subtrativa por supressão de hibridização de cDNA contrastando o perfil transcricional global de raízes de feijoeiro BAT 477 e IAC-Carioca 80SH, respectivamente tolerante e suscetível ao estresse, e identificaram 1120 unigenes validados como associados a resposta de tolerância do genótipo BAT 477 ao estresse. A montagem *de novo* de um transcriptoma de feijoeiro sob condição de déficit hídrico contrastando dois reservatórios gênicos de *P. vulgaris* (Mesoamericano e Andino) revelaram um conjunto de 9.298 unigenes potencialmente implicados no processo de tolerância ao estresse (WU et al., 2014). Proteínas envolvidas no metabolismo energético, fotossíntese, conversão de ATP, síntese proteica e proteólise, foram identificadas como diferencialmente reguladas em um proteoma que contrastava dois genótipos de feijoeiro quanto ao potencial de tolerância a déficit hídrico (ZADRAŽNIK et al., 2013).

#### **2.4 Interação Simbiótica com Fungos Micorrízicos Arbusculares**

Sendo a principal interface existente entre a planta e o solo, as raízes estão em constante contato com a microbiota residente. A grande quantidade de relações plantas-microorganismos

resulta na formação de um ambiente dinâmico conhecido como rizosfera onde as comunidades microbianas também interagem (BAREA et al., 2005). Algumas classes de microrganismos podem modificar de forma benéfica a estrutura radicular da planta hospedeira, aumentar a absorção de água e nutrientes, proporcionar tolerância a estresses como a seca e o ataque de patógenos, e aumentar a biomassa (CHAKRABORTY; PANGGA; ROPER, 2012). Relações benéficas entre plantas e microrganismos incluem (i) bactérias rizosféricas e/ou fungos que podem promover o crescimento da planta e/ou fixar nitrogênio sem a formação de novos órgãos; (ii) bactérias nodulantes fixadoras de nitrogênio tais como *Rhizobium* e *Frankia*; (iii) fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e ectomicorrízicos; e (iv) bactérias e fungos endofíticos nas raízes (CHAKRABORTY; PANGGA; ROPER, 2012).

A simbiose que ocorre entre as raízes das plantas e os fungos ocorre de diferentes formas e é conhecida como ‘micorriza’. O termo deriva do Grego ‘*mycos*’ que significa fungo e ‘*rhiza*’ que significa raiz e foi cunhado por Frank (1885) (SANDERS; CROLL, 2010). Nas ectomicorrizas, principalmente encontradas em espécies arbóreas de regiões temperadas, o parceiro simbiótico se localiza externamente às células do hospedeiro, enquanto que nas endomicorrizas, que incluem as ericóides, típicas das orquídeas, e as arbusculares (FMA) parte da hifa do fungo se encontra dentro das células do hospedeiro (PARNISKE, 2008).

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são provavelmente as mais abundantes de todas as relações simbióticas que ocorrem no solo (450 milhões de anos), e são formadas entre cerca de 80% das plantas terrestres e fungos que pertencem principalmente ao filo monofilético *Glomeromycota*, recaindo principalmente sob quatro famílias: *Diversisporales*, *Glomerales*, *Archeosporalles* e *Paraglomerales* (FITTER, 2005; REDECKER et al., 2013). O desenvolvimento da simbiose resulta na formação de estruturas fúngicas no formato de ‘pequenas árvores’ no interior das células hospedeiras conhecidas como arbúsculos (do Latim ‘*arbusculum*’, que significa arbusto, ou pequena árvore) (PARNISKE, 2008).

A interação plantas-FMA se inicia na rizosfera em resposta à secreção por parte da planta de hormônios conhecidos como estrigolactonas (ARTHIKALA et al., 2013). Em resposta, FMA liberam no ambiente moléculas sinais constituídas de lipo-quitooligossacarídeos (LCOs) conhecidas como fatores *Myc*. As estrigolactonas irão estimular a ramificação das hifas e o metabolismo do fungo enquanto que os fatores LCOs-*Myc* estimulam a ramificação das raízes e estimulam a expressão nas plantas de genes associados à simbiose antes que o contato físico entre ambos os parceiros ocorra. Tanto os exudados dos esporos fúngicos, quanto o contato com o apressório, provocam a liberação de picos de cálcio (Ca) na epiderme das raízes das plantas. Seguido do estabelecimento do apressório na epiderme da raiz,

as células epidérmicas sofrem um rearranjo estrutural polarizado de seus citoplasmas que conduzem para a formação do aparato de pré-penetração através dos quais a planta direcionará o crescimento das hifas para o interior da raiz. O sucesso na colonização é determinado, portanto pelo desenvolvimento da hifa por regiões intra e intercelulares do córtex radicular que terminarão na formação dos arbúsculos no interior de células do córtex interno. Os arbúsculos permanecem isolados do citoplasma celular da planta por uma estrutura derivada da membrana plasmática, chamada membrana periarbuscular. Será através dessas estruturas e espaços que o fungo irá oferecer nutrientes (especialmente fósforo) e água (FINLAY, 2008) para a planta. Em retorno, os fungos irão obter carboidratos das plantas (SOLAIMAN; SAITO, 1997; BAGO et al., 2003). Aproximadamente, 20% dos produtos fotossintetizados pelas plantas são estimados em serem consumidos pelos FMA (BAGO; PFEFFER; SHACHAR-HILL, 2000).

Os efeitos benéficos dos FMA são mais aparentes sob condições limítrofes de disponibilidade de nutrientes (PARNISKE, 2008). Embora ainda não se conheça todos os mecanismos regulatórios, a quantidade total de colonização das raízes tende a diminuir quando tais nutrientes se encontram em abundância (PARNISKE, 2008).

As hifas podem se espalhar pelo solo, ramificando-se por diversos centímetros a partir da superfície infectada da raiz da planta, embora este fungo não seja capaz de viver de forma autônoma no ambiente (ISAAC, 1992). A infecção de novas raízes a partir de hifas que já se encontram associadas a uma planta pode ocorrer. Existe pouca especificidade entre os parceiros que formam micorrizas (ISAAC, 1992). Aparentemente, a infecção primária é muito importante para o estabelecimento de culturas de interesse agrônômico e podem ter uma grande influência na produtividade. Tal fator é empregado por agricultores para regular o balanço nutricional entre gramíneas e leguminosas cultivadas em consórcio (BAREA; AZCON-AGUILAR, 1983). Segundo Francis et al. (1986), as hifas dos fungos são capazes de estabelecer uma interconexão entre as raízes de diferentes plantas permitindo a transferência de nutrientes entre uma planta e outra. Um exemplo seria o consórcio benéfico de feijoeiro (*P. vulgaris* L.) com milho (*Zea mays*). Na América Latina, 80% da produção de feijão ocorrem em plantios consorciados, principalmente com o milho, sendo uma importante fonte de nitrogênio e fósforo para esta cultura (HUNGRIA et al., 1997). Análises conduzidas por Hungria et al. (1997), revelaram que em condições controladas, tanto os exsudados de feijão como os de milho estimularam a sobrevivência, o crescimento e a indução de genes *nod* de *Rhizobium*, a nodulação e o acúmulo de nitrogênio no feijoeiro e a sobrevivência de *Azospirillum lipoferum*, além de estimular o aumento no número de espécies de FMA.

## 2.5 O papel das FMA na tolerância à seca em plantas

A simbiose plantas-FMA é conhecida pelo seu efeito benéfico em estimular crescimento e qualidades nutricionais elevadas para o hospedeiro. Desta forma, existe um crescente interesse em comprovar sua efetividade em sistemas naturais e conseqüentemente, em manipulá-los, quando adequado, para que possam ser incorporados em sistemas agrícolas de produção. Algumas evidências demonstram que o uso de inóculos de FMA (autóctenos ou alotóctenos) podem beneficiar culturas anuais tais como cereais e leguminosas, hortaliças, culturas frutíferas e espécies ornamentais (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1997; BAREA et al., 2005). A seleção do inóculo adequado de FMA, sua produção e a análise dos processos ecológicos envolvidos nessa inoculação são questões essenciais a serem consideradas antes da aplicação desta tecnologia na agricultura (BAREA et al., 2005).

A possibilidade de aumentar a tolerância à seca em plantas via inoculação com FMA têm sido amplamente investigada (AUGÉ, 2001; RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014; SAIA et al., 2014). A simbiose irá proteger a planta contra os efeitos nocivos do déficit hídrico principalmente através de mecanismos para se evitar a seca (AUGÉ, 2001; RUIZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Tais mecanismos se baseiam principalmente na habilidade de manter um estado adequado de hidratação em toda a planta e é caracterizado principalmente por níveis elevados da quantidade relativa de água em tecidos foliares. Além disso, plantas micorrizadas foram classificadas também como tolerantes à seca principalmente devido a um melhorado ajuste osmótico que contribui para uma melhor hidratação e turgor celular foliar a ser mantido quando o potencial hídrico é baixo (RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014).

Raízes de plantas nativas de ecossistemas áridos e semiáridos frequentemente exibem um alto nível de colonização por FMA, indicando uma considerável relevância da simbiose para o desempenho sob déficit hídrico (TCHABI et al., 2008). Uma das explicações mais comuns para o estado nutricional superior de plantas micorrizadas é a maior superfície de absorção oferecida pelas hifas no solo aliadas a habilidade do fungo em absorver água a partir do solo com baixo potencial hídrico (AUGÉ 2001; RUIZ-LOZANO, 2003a). O diâmetro médio das hifas (2-5  $\mu\text{m}$ ) é até duas vezes menor que o diâmetro médio de uma raiz (10-20  $\mu\text{m}$ ), um traço que confere às hifas o potencial de acessar poros menores no solo que costumam reter água e nutrientes durante o processo de dessecação. Isso permite contornar as zonas de esgotamento de água e nutrientes e conseqüentemente, uma maior exploração do solo que em contrapartida podem também induzir um crescimento mais denso das raízes (MIRANSARI et al., 2007).

Adicionalmente, uma grande variedade de microrganismos, entre eles FMA, demonstrou produzir auxinas e influenciar o desenvolvimento do hospedeiro (SLANKIS, 1973). Auxinas tipicamente inibem a elongação das raízes e promovem o desenvolvimento de raízes laterais (CHAKRABORTY; PANGGA; ROPER, 2012). Em diversos sistemas envolvendo simbioses com FMA, plantas micorrizadas apresentaram maior volume de raízes laterais do que plantas não-micorrizadas (BERTA et al., 1990; BERTA; TROTTA; FUSCONI, 1995; HOOKER; MUNRO; ATKINSON, 1992; GIANINAZZI, 1996; YANO; YAMAUCHI; KONO, 1996; GUTJAHR; CASIERI; PASZKOWSKI, 2009; ORFANOUDAKIS; WHEELER; HOOKER, 2010). *Rhizophagus irregulares* (sn. *Glomus intraradices*) estimulou a formação de raízes laterais finas e expeças em *Oriza sativa* e *Z. mays* (KALDORF; LUDWIG-MÜLLER, 1999; GUTJAHR; CASIERI; PASZKOWSKI, 2009), enquanto que *Glomus clarum* e *Gigaspora decipiens* aumentaram a biomassa radicular em *Aquilaria filaria* e *Dyera polyphylla* (TURJAMAN et al., 2006).

Outros fatores que influenciam consideravelmente a resposta da planta a colonização por FMA são a identidade dos parceiros FMA envolvidos e a diversidade de espécies e raças de inóculos disponíveis, além de condições físico-químicas do solo como pH e disponibilidade de nutrientes, intensidade de luz e temperatura (JANSA; SMITH; SMITH, 2008). A maior parte dos trabalhos publicados referentes ao papel das FMA na melhoria das condições fisiológicas dos hospedeiros foram obtidos a partir de estudos onde plantas foram inoculadas com isolados únicos de FMA e não referem a realidade dos sistemas naturais de produção onde mais de uma espécie de FMA costuma estar presente no sistema radicular. Foi sugerido que se uma planta é colonizada por espécies de FMA que são complementares em suas funções, como na coleta de nutrientes a partir de diferentes reservatórios no solo, elas podem provar serem mais benéficas à planta como uma mistura do que individualmente (KOIDE, 2000; GUSTAFSON; CASPER, 2006). Jansa, Smith e Smith (2008), estudando dois sistemas hospedeiros, *Medicago truncatula* e *Allium porrum*, inoculados por três espécies de FMA, *Glomus mossae*, *Glomus claroideum* e *G. intraradices*, ambos em mistura e de forma isolada, perceberam que embora nos sistemas de mistura existisse uma predominância de *G. mossae*, o potencial para absorção de fósforo em *A. porrum* foi maior quando a mistura *G. claroideum* e *G. intradices* foi aplicada do que em experimentos individuais.

Em estudo similar (GRÜMBERG; URCELAY, 2015), realizou estudos de tolerância a déficit hídrico em soja (*Glycine max*) submetida a mistura e isolados de três espécies de FMA, *Septoglomus constrictum*, *Glomus sp.* e *Glomus aggregatum* e percebeu que sob condições de estresse a cultura apresentou menores níveis de colonização no tratamento de mistura. Além

disso, embora sob condições hídricas ideais a mistura tenha resultado em uma maior absorção de nitrogênio (N) pelas plantas, sob seca não houve diferenças significativas entre isolados e misturas na redução de danos oxidativos ao hospedeiro ou na concentração de osmólitos solúveis tais quais açúcares e prolina. De fato, os resultados apontaram que sob a condição de estresse o potencial de um isolado em mitigar seu impacto sob a planta hospedeiro pode ser diminuído em virtude do aumento na competição com outras espécies pelos recursos disponíveis em um sistema que pode se tornar tão limítrofe como uma cultura mantida em vasos em casa de vegetação.

Mais de 80% de todos os estudos conduzidos sob a interação planta-FMA em condições de déficit hídrico demonstraram um melhor desempenho destas plantas quando comparadas a controles não colonizados (AUGÉ, 2001). Entretanto, na maioria destes estudos as plantas foram expostas em média a um período relativamente curto de estresse (7-14 dias) antes da coleta (NEUMANN; GEORGE, 2009). Neste sentido, Newmann e George (2009), investigaram os efeitos dos FMA (*G. intraradices* e *G. mosseae*) sobre o acúmulo de nutrientes, crescimento e absorção de água em duas variedades de feijão-caupi (*V. unguiculata*) quando submetidas a um período de déficit hídrico de 24 dias. Newmann e George (2009) observaram que para ambas as variedades 'Space-10' e 'carioca-velho' a colonização com FMA aumentou a absorção de nutrientes em plantas sob déficit hídrico, entretanto, a absorção de água, o crescimento e a rede fotossintética se mantiveram inalteradas. A recuperação destas plantas colonizadas após a reidratação foi muito maior nas plantas colonizadas por FMA do que nos controles não inoculados, provavelmente devido à melhoria da absorção de P.

Cultivares obtidas através de técnicas de melhoramento frequentemente exibem um maior crescimento e superior capacidade de absorção de nutrientes quando comparadas com variedades antigas, seja sob condições ótimas de crescimento, seja sob situações de estresse como déficit hídrico ou baixas concentrações de nutrientes (GUARDA; PADOVAN; DELOGU, 2004). Investigações prévias têm demonstrado que diferentes cultivares da mesma espécie de planta podem divergir-se consideravelmente na intensidade com que se beneficiam da relação simbiótica com FMA quando sob déficit hídrico. Em um estudo conduzido por Al-Karaki e Al-Raddad (1997), foram analisados os efeitos da micorrização sob dois genótipos de trigo, CR057 e CR006, sob déficit hídrico. O genótipo CR057, considerado tolerante, demonstrou maior micorrização do que o suscetível, CR006. Além disso, sob déficit hídrico, o genótipo tolerante em simbiose com o fungo revelou maior massa seca de raiz e maior comprimento radicular, fatores esses associados pelos autores ao aumento na concentração de

P destas plantas em simbiose, o que segundo eles elevariam taxas fotossintéticas que resultariam no crescimento da planta.

Os efeitos diretos da micorrização sobre as relações hídricas da planta são difíceis de serem distinguidos de outros fatores que advém da colonização tais como melhor nutrição, alterações na alocação de carbono e aumento nas taxas de crescimento (ANDERSEN; RYGIEWICZ, 1991a). Embora alguns estudos tenham revelado que os efeitos da micorrização sobre a condutância hídrica de plantas sejam limitados, ou não diretamente relacionados (COLEMAN; BLEDSOE; SMIT, 1990), o crescimento de gramíneas da espécie *Fraxinus pennsylvanica* foi alterado pela colonização por FMA e demonstraram uma grande influência sobre a condutância hídrica das raízes (ALLEN; BOOSALIS, 1983). A colonização por FMA de raízes de *Pseudotsuga menziessi* afetou de forma diferencial a condutância hidráulica de raízes, e os efeitos foram dependentes não somente da morfologia das raízes e das espécies de fungos, mas principalmente da concentração de P das raízes (COLEMAN; BLEDSOE; SMIT, 1990). A relação entre a alocação de biomassa e o déficit hídrico é complexa e os efeitos colaterais aparentam possuir grande importância (ANDERSEN; RYGIEWICZ, 1991b).

O déficit hídrico irá afetar o desenvolvimento da micorrização, mas este será um efeito secundário sobre alterações estruturais nas raízes das plantas (FEIL; KOTTKE; OBERWINKLER, 1988). A sazonalidade das secas pode também influenciar no processo de micorrização (ANDERSEN; RYGIEWICZ, 1991b), por exemplo, em períodos alternados de seca que geram na planta um aumento na densidade das raízes, sucedidos por irrigação, estimulando assim a alongação das raízes, produzirão, quando repetidos com determinada frequência, uma taxa de micorrização mais elevada, e o crescimento da planta pode ser reduzido devido à competição por depósitos de carbono abaixo e acima da superfície (KOTTKE; SORO; BERGER, 1999). Se o ciclo seca/reidratação não é frequente (por exemplo, uma vez ao ano), irão ocorrer raízes com uma maior densidade de ramificação e menor micorrização (KOTTKE; SORO; BERGER, 1999). Irrigação constante resultará em maior alongação da raiz e um sistema de micorrizas que é regular, mas não densamente ramificado (KOTTKE; SORO; BERGER, 1999). Respostas similares de crescimento foram evidenciadas em raízes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) durante períodos de reidratação (com intervalos de três dias) (SHONE; FLOOD, 1983).

Outro fator a ser considerado acerca da influência de sistemas radiculares e micorrização sobre a tolerância de plantas ao estresse hídrico é a relação tripartite de simbiose em leguminosas. Estudos sobre a simbiose *Rhizobium* – leguminosas revelaram que o aumento no conteúdo de trehalose (sintetizado pelas bactérias) nos nódulos de raízes sobre déficit hídrico

estão diretamente correlacionados com o aumento na tolerância destas plantas ao estresse (BALLESTEROS-ALMANZA et al., 2010). Apesar de existirem poucos estudos sobre o conteúdo deste carboidrato em FMA, Ballesteros-Almanza et al. (2010) propuseram um experimento que objetivava entender de que maneira a simbiose tripartite influenciava tal mecanismo de resistência em três genótipos selvagens de feijoeiro (*Phaseolus filiformes*, *P. acutifolius* e *P. vulgaris*) e dois comerciais (Pinto Villa e Flor de Mayo), todos sob estresse hídrico, co-inoculados com *G. intraradices* e uma mistura de sete cepas nativas de *Rhizobium*. Os resultados demonstraram que em geral, para todos os genótipos, quando sob déficit hídrico, a presença da FMA teve um efeito negativo sob a nodulação, pois de alguma forma diminuíram a concentração do açúcar nestes, o que é vital para a manutenção das colônias bacterianas durante o estresse e conseqüentemente, para o crescimento das plantas. Portanto, fica evidente que o uso separado de FMA e *Rhizobium* resultaria em melhor resistência das plantas quando sob déficit hídrico.

## 2.6 Alterações bioquímicas e metabólicas em plantas inoculadas por FMA

A resposta das plantas à seca mediada pela micorrização é um processo complexo e que envolve a indução e repressão de diversos processos bioquímicos e vias metabólicas, entre eles: (i) a absorção e transferência direta de água e nutrientes pelo fungo; (ii) aumento no ajuste osmótico; (iii) melhorias nas trocas gasosas e na eficiência do uso da água; e (iv) melhor proteção contra danos oxidativos (RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014).

O papel das enzimas removedoras de EROs sintetizadas durante a resposta ao estresse abiótico, ou mesmo durante a resposta de hipersensibilidade, durante a interação com FMA em plantas ainda é pouco compreendida (LAMBAIS; RÍOS-RUIZ; ANDRADE, 2003). Altos níveis de atividade de SOD foram observadas em raízes de *Lactuca sativa* colonizadas por *G. mossae* e *G. deserticola* em plantas sujeitas a déficit hídrico (RUIZ-LOZANO; AZCÓN; PALMA, 1996). Três fragmentos de cDNA, que codificam para enzimas SOD, foram clonados a partir de raízes de *L. sativa* e demonstraram ser fortemente induzidos em raízes colonizadas por FMA e sob déficit hídrico (RUIZ-LOZANO et al., 2001). A indução de enzimas CAT foi também observada em raízes noduladas de soja colonizadas por *G. mossae* sob condições ideais de hidratação, mas não sob déficit hídrico, enquanto a atividade de glutathione redutase (GR) foi induzida em ambas as situações (PORCEL; BAREA; RUIZ-LOZANO, 2003). Inoculação com *R. intraradices* em plantas de *Trifolium repens* levaram ao aumento na atividade de GR no caule (ORTIZ et al., 2015).

Lambais, Ríos-Ruiz e Andrade (2003) avaliaram a atividade enzimática de SOD, guaiacol-peroxidase (GPX) e catalase (CAT) em feijoeiro (*P. vulgaris* L., cv. IAC-Carioca 80SH) inoculadas com *G. clarum* sob condições variadas de disponibilidade de P. A enzima SOD foi induzida somente em raízes inoculadas com *G. clarum* em estágios avançados de simbiose sobre baixa disponibilidade de P, e em estágios precoces de simbiose sobre alta disponibilidade de P. GPX foi induzida em interação com *G. clarum* em estágios iniciais de desenvolvimento da simbiose sob baixo P. CAT foi induzida em todos os estágios de desenvolvimento de colonização que envolviam baixo P.

O ajuste osmótico em plantas sob déficit hídrico, ou o acúmulo de solutos pelas células, é um processo pelo qual o potencial hídrico pode diminuir sem que haja diminuição na turgidez. A função primária básica de osmólitos tais como a prolina é o ajuste osmótico, mantendo o turgor celular e conseqüentemente o gradiente osmótico necessário para a retenção de água, entretanto estudos mais recentes apontam para o fato de que estes solutos podem também agir na localização de radicais livres ou como chaperonas estabilizando membranas ou proteínas (WANG; VINOGRAD; ALTMAN, 2003). Em estudo conduzido por Porcel; Azcón; Ruiz-Lozano (2004), foram clonados dois genes *D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (p5cs)*, *gmp5cs* de *G. max* e *lsp5cs* de *L. sativa*, e analisados seus perfis de expressão em ambas as espécies colonizadas ou não por FMA sob déficit hídrico. Em ambos os casos, a exposição à seca levou à um aumento na expressão destes genes, porém este aumento foi muito menor em plantas colonizadas com o fungo. Ortiz et al. (2015) encontrou evidências de que o caule de plantas de *T. repens* inoculadas com *R. intraradices*, além *Pseudomonas putida*, acumulou elevadas concentrações de prolina sob condição de déficit hídrico em detrimento ao observado em raízes no mesmo tratamento.

Diversos dos genes induzidos por estresses abióticos são regulados pela presença do hormônio ABA cuja concentração é aumentada em resposta ao déficit hídrico e em baixas temperaturas (BRAY; BALLEY-SERRES; WERETILNIK, 2000). O papel desempenhado por este hormônio em plantas sob déficit hídrico está principalmente relacionado ao fechamento estomático e à indução da expressão gênica. Mudanças no padrão da expressão gênica em plantas colonizadas por FMA durante o déficit hídrico têm sido relatadas como sendo causadas principalmente por aumentos nas concentrações deste hormônio nas raízes (RUIZ-LOZANO; PORCEL; AROCA, 2006). A simbiose com os FMA costuma conduzir a um aumento na concentração de ABA na planta hospedeira (ESTRADA-LUNA; DAVIES, 2003). Aroca, Vernieri e Ruiz-Lozano (2008), analisaram o papel de ABA exógeno na regulação gênica de *L. sativa* colonizadas com FMA sob déficit hídrico. Neste experimento, eles descobriram que

quando na presença do fungo, estes diminuíram consideravelmente a concentração do hormônio na planta adiando desta forma a expressão de marcadores gênicos para o estresse: os genes *Lsp5cs*, *Lslea* e *Lsnced*.

Um grupo de genes considerado como adaptativos à seca e que têm sido identificados em vários trabalhos que analisam respostas de plantas ao déficit hídrico são aqueles que codificam para as chamadas proteínas LEA. As prováveis funções destas proteínas, em sua maioria hidrofílicas, são relacionadas com sequestro de íons, proteção de membranas, dobramento de proteínas (chaperonas) e retenção de água (BRAY, 1993; ZHU et al., 1997). Em outro estudo publicado por Porcel; Azcón; Ruiz-Lozano (2005), três genes que codificam para *dehidrinas* (Lea grupo D-11), dois (*gmlea8* e *gmlea10*) de *G. max* e um de *L. sativa* (*lslea 1*) tiveram seus níveis de expressão analisados em ambas as espécies, na presença de FMA e sob tratamento de déficit hídrico. No caso da soja, para ambos os genes testados foram confirmadas a expressão aumentada destes nos tratamentos sob estresse, porém em plantas inoculadas com o fungo este aumento não foi evidenciado, sendo que este padrão se repetiu nos estudos com alface.

Evidências sugerem que a simbiose com FMA regule as propriedades hidráulicas da raiz, incluindo a condutividade hidráulica, fato relacionado a regulação de aquaporinas em plantas (AROCA; PORCEL; RUIZ-LOZANO, 2007). Roussel et al. (1997) e Krakinski et al. (2000), foram os primeiros a reportarem a indução da expressão de aquaporinas do tipo TIP (*tonoplast intrinsic protein*) por FMA em salsa (*Agrostis salsa*) e *M. truncatula* respectivamente. Krajinski et al. (2000), analisaram as propriedades de transporte da proteína TIP, MtAQP1, evidenciando sua função na condutância de água e sugeriram que a indução em sua expressão é importante para a otimização do transporte de água após as alterações que ocorrem nas células vegetais devido a formação da simbiose.

A membrana periarbuscular que envolve o arbúsculo no interior das células hospedeiras possui uma alta densidade de diferentes sistemas de transporte, incluindo aquaporinas (UEHLEIN et al., 2007). A membrana periarbuscular manteria o arbúsculo completamente apoplástico, portanto, de forma a manter a simbiose, este local deve ser um ponto de intensa troca transmembranar de água e solutos entre os parceiros. Seis aquaporinas (*MtPIP1;1*, *MtPIP2;1*, *MtNIP1*, *MtNIP2*, *MtNIP3* e *MtNIP4*) foram identificadas em *M. truncatula*. Aumento na expressão de duas delas, *MtPIP2;1* e *MtNIP1*, foi detectado quando da interação com *G. mossae*, sendo que ambas apresentaram comportamentos distintos em relação à função. *MtPIP2;1* se mostrou altamente permeável à água e glicerol no sistema heterólogo de oócitos de *Xenopus*, enquanto que *MtNIP1* (assim como *MtNIP2* e

3 negativamente expressas na presença de FMA) demonstraram ser permeáveis para a absorção de amônia, resultados estes comprovados por expressão heteróloga em leveduras.

Foi demonstrado em *Nicotiana tabacum*, que a expressão de *NtAQPI* é afetada sob condições de seca em plantas não micorrizadas (SIEFRITZ et al., 2002). O efeito de repressão foi também analisado em plantas *antisense* para *NtAQPI* micorrizadas sob condições de déficit hídrico e controle irrigado (PORCEL et al., 2005). Redução da expressão de *NtAQPI* não teve efeito sobre a colonização das raízes das plantas por FMA. Entretanto, sob condições de seca o peso da matéria seca e fresca das raízes das variedades selvagens de tabaco demonstraram ser maiores do que nas plantas *antisense* de *NtAQPI*. Portanto, o transporte de água mediado por *NtAQPI* parece ser importante para a simbiose sob seca.

Peng et al. (2007) super-expressaram uma aquaporina (*PgTIP1*) em *Arabidopsis* e observaram um aumento significativo no crescimento da planta quando submetida ao déficit hídrico. Porcel et al. (2006) revelaram que, sob condições de déficit hídrico, a FMA da espécie *G. mosseae* aumenta a repressão, em raízes de soja (*G. max*), de um gene PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*) e também a diminuição da expressão de outros dois genes PIP em raízes de *L. sativa*. Em outro estudo, Ouziad et al. (2006) descobriu que uma mistura de diferentes FMA também diminuíram a expressão de um gene PIP nas raízes de tomateiro sob altas concentrações de sal.

Em estudos conduzidos por Aroca; Porcel; Ruiz-Lozano (2006) envolvendo a interação de feijoeiro (*P. vulgaris* L., cv. Borloto) e FMA, foi encontrado que a relação simbiótica estabelecida regula e melhora as propriedades de condutância osmótica hidráulica da raiz sob estresses hídricos, salinos e de frio. A regulação das propriedades hidráulicas da raiz demonstrou estar amplamente correlacionada com a regulação da quantidade de proteínas PIP2 e seu estado de fosforização. Ao mesmo tempo, a expressão de cada gene PIP analisado respondeu diferencialmente a cada estresse, e esta resposta também dependeu da presença de FMA. Estes resultados demonstraram que cada gene PIP analisado poderia ter uma função e regulação diferente para a simbiose com FMA sob as condições específicas de cada estresse estudado.

Giovannetti et al. (2012), estudando o padrão de expressão gênica de duas aquaporinas de grupos distintos, *LjNIP1* e *LjXIP1*, em raízes micorrizadas de *Lotus japonicus* com o auxílio da metodologia de microdissecção a laser por microscopia, puderam observar que o gene *LjNIP1* é expresso exclusivamente em células contendo arbúsculos. Análises de expressão heteróloga desta proteína em células transformadas de levedura revelaram seu potencial para transporte de H<sub>2</sub>O e análises de microscopia confocal da construção contendo GFP (*Green*

*fluorescent protein*) indicaram seu acúmulo na região da membrana periarbuscular. Para *LjXIP1*, superexpressão deste gene só foi detectada em raízes micorrizadas, porém traços dos transcritos deste gene foram encontrados em toda a raiz e não somente em células arbusculadas.

Em estudo conduzido por Navarro-Ródenas et al. (2013), foram feitos o isolamento, caracterização funcional e a análise de expressão em raízes e folhas de *Helianthemum almeriense* de forma a avaliar seu papel na tolerância a déficit hídrico. Cinco transcritos, denominados *HaPIP1;1*, *HaPIP1;2*, *HaPIP2;1*, *HaPIP2;2*, e *HaTIP1;1*, foram isolados. Caracterizações funcionais por meio de expressão heteróloga em levedura confirmaram que *HaPIP1;1*, *HaPIP2;1* e *HaTIP1;1* codificam para canais funcionais de transporte de água, com papéis divergentes quanto ao transporte deste solvente além de NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub>. Os padrões de expressão dos genes selecionados foram analisados em sistemas micorrizados e não micorrizados, sob condições de estresse e controle irrigado. Algumas das aquaporinas analisadas foram diferencialmente reguladas somente na ocorrência do déficit hídrico; *HaPIP1;1*, foi mais induzida em plantas não micorrizadas, independentemente do tratamento de irrigação, *HaPIP1;2* apresentou maior indução em plantas controle do que em situação de seca, independentemente da micorrização. Além disso, constatou-se que durante o estresse o padrão de micorrização das plantas se tornou mais intracelular. Ambos os fatores em conjunto resultaram em uma melhor adaptação morfofisiológica das plantas micorrizadas ao período de seca.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-GALLEGOS, J.A.; PADILLA-RAMÍREZ, S.; ESQUIVEL-ESQUIVEL, G.; LÓPEZ-SALINAS, E.; AGUILAR-GARZÓN, B.; MAYEK-PÉREZ, N.; KELLY, J.D. Seed yield of diverse bean cultivars grown in three regions of Mexico. In: BEAVER, J.; KELLY, J.; MIKLAS, P.; PARK, S.J.; SCHWARTZ, H.F.; VANDENBERG, B.; KMIETEK, K.; KUROWSKI, C.; MYERS, J.; RILEY, R.; RON, A. (Ed.). **The XLVII Report of the Bean Improvement Cooperative**. 1. ed. Sacramento: BIC, 2004. 356 p.
- AL-KARAKI, G.; AL-RADDAD, A. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress on growth and nutrient uptake of two wheat genotypes differing in drought resistance. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 7, p. 83–88, 1997.
- ALLEN, M. F.; BOOSALIS, M. G. Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance on winter wheat. **New Phytologist**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 67-76, 1983.
- ANDERSEN, C. P.; RYGIIEWICZ, P. T. Stress interactions and mycorrhizal plant response: understanding carbon allocation priorities. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 73, n. 3-4, p. 217–244, 1991a.
- ANDERSEN, C. P.; RYGIIEWICZ, P. T. Stress interactions and mycorrhizal plant response: understanding carbon allocation priorities. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 73, n. 3-4, p. 217–44, 1991b.
- ARANJUELO, I.; MOLERO, G.; ERICE, G.; AVICE, J. C.; NOGUÉS, S. Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 111–123, 2011.
- AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? **New Phytologist**, Oxford, v. 173, n. 4, p. 808–816, 2006.
- AROCA, R.; VERNIERI, P.; RUIZ-LOZANO, J. M. Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 8, p. 2029–41, 2008.
- ARTHIKALA, M. K.; MONTIEL, J.; NAVA, N.; SANTANA, O.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, R.; CÁRDENAS, L.; QUINTO, C. PvRbohB negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 54, n. 8, p. 1391–1402, 2013.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 11, n. 1, p. 3–42, 2001.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 6, p. 457–464, 1997.

BAREA, J. M.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing plants. **Advances in agronomy**, v. 36, p. 1-47, 1983.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 949–958, 2000.

BAGO, B.; PFEFFER, P. E.; ABUBAKER, J.; JUN, J.; ALLEN, J. W.; BROUILLETTE, J.; DOUDS, D. D.; LAMMERS, P. J.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 1496–1507, 2003.

BALLESTEROS-ALMANZA, L.; ALTAMIRANO-HERNANDEZ, J.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; SANTOYO, G.; SANCHEZ-YAÑEZ, J. M.; VALENCIA-CANTERO, E.; MACIAS-RODRIGUEZ, L.; LOPEZ-BUCIO, J.; CARDENAS-NAVARRO, R.; FARIAS-RODRIGUEZ, R. Effect of co-inoculation with mycorrhiza and rhizobia on the nodule trehalose content of different bean genotypes. **The Open Microbiology Journal**, Beijing, v. 4, p. 83–92, 2010.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 2005.

BEEBE, S. E.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Phenotyping common beans for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 4, p. 1–20, 2013.

BEEBE, S.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; BUTARE, L. Breeding for abiotic stress tolerance in common bean: Present and future challenges. In: AUSTRALIAN PLANT BREEDING, 14.; SABRAO CONFERENCE, 11., 2009, Brisbane, Australia. **Proceedings...** Brisbane, Australia: Global Partnership Initiative for Plant Breeding Capacity Building (GIPB), 2009.

BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A.; SCANNERINI, S. Morphogenetic Modifications Induced by the Mycorrhizal Fungus *Glomus* Strain E3 in the Root System of *Allium porrum* L. **New Phytologist**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 207–215, 1990.

BERTA, G.; TROTTA, A.; FUSCONI, A. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 281–293, 1995.

BLAIR, M. W.; GALEANO, C. H.; TOVAR, E.; TORRES, M. C. M.; CASTRILLÓN, A. V.; BEEBE, S. E.; RAO, I. M. Development of a Mesoamerican intra-genepool genetic map for quantitative trait loci detection in a drought tolerant × susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 29, n. 1, p. 71–88, 2012.

BOHNERT, H. J.; SHEVELEVA, E. Plant stress adaptations--making metabolism move. **Current Opinion in Plant Biology**, Kidlington, v. 1, n. 3, p. 267–274, 1998.

BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, Oxford, v. 162, n. 3, p. 671–681, 2004.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1035–1040, 1993.

BRAY, E. A.; BALLEY-SERRES, J.; WERETILNIK E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2000. pt. 5.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 55–128, 2003.

CHAKRABORTY, S.; PANGGA, I. B.; ROPER, M. M. Climate change and multitrophic interactions in soil: the primacy of plants and functional domains. **Global Change Biology**, Chichester, v. 18, n. 7, p. 2111–2125, 2012.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.

COHEN, D.; BOGEAT-TRIBOULOT, M.-B.; TISSERANT, E.; BALZERGUE, S.; MARTIN-MAGNIETTE, M.-L.; LELANDAIS, G.; NINGRE, N.; RENOU, J.-P.; TAMBY, J.-P.; LE THIEC, D.; HUMMEL, I. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. **BMC Genomics**, London, v. 11, p. 630, 2010.

COLEMAN, M. D.; BLEDSOE, C. S.; SMIT, B. A. Root hydraulic conductivity and xylem sap levels of zeatin riboside and abscisic acid in ectomycorrhizal Douglas fir seedlings. **New Phytologist**, Oxford, v. 115, n. 2, p. 275–284, 1990.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: v. 2 Safra 2014/15, n. 11 – Décimo primeiro levantamento. Brasília, DF: CONAB, 2015. 101 p.

DEEBA, F.; PANDEY, A. K.; RANJAN, S.; MISHRA, A.; SINGH, R.; SHARMA, Y. K.; SHIRKE, P. A.; PANDEY, V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 53, p. 6–18, 2012.

DIETZ, K.-J.; PFANNSCHMIDT, T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, n. 4, p. 1477–1485, 2011.

ESTRADA-LUNA, A. A.; DAVIES, F. T. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 9, p. 1073–1083, 2003.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; JONES, C. A. Common bean and cowpea. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Growth and mineral nutrition of field crops**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 391-424.

FAIZE, M.; BURGOS, L.; FAIZE, L.; PIQUERAS, A.; NICOLAS, E.; BARBA-ESPIN, G.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; ALCOBENDAS, R.; ARTLIP, T.; HERNANDEZ, J. A. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 2599–2613, 2011.

FEIL, W.; KOTTKE, I.; OBERWINKLER, F. The Effect of drought on mycorrhizal production and very fine root-system development of Norway spruce under natural and experimental conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, n. 2, p. 221–231, 1988.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. General concepts. In: JIMÉNEZ, A.; SMITHSON, J. B. (Ed.). **Stages of development of the common bean plant**. Study guide. 2. ed. Cali: CIAT, 1986.

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

FITTER, A. H. Darkness visible: Reflections on underground ecology. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 231–243, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 11, n. 4, p. 861–905, 2009.

FRANCIS, C. A. **Multiple cropping systems**. New York: Macmillan Publishing, 1986. 383p.

FRANK, A. B. Ueber die Wurzelsymbiose beruhende Ernahrung gewisser Baumer durch unterirdische Pilze. In: EAGLE, K. (Ed.). **Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft**. 1. ed. Frankfurt: Wiley, 1885. p. 128–145.

GALEANO, C. H.; GOMEZ, M.; RODRIGUEZ, L. M.; BLAIR, M. W. CEL I nuclease for SNP discovery and marker development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Science**, Madison, v. 49, n. 2, p.381–394, 2009.

GEPTS, P.; ARAGAO, F.; BARROS, E.; BLAIR, M. W.; BRONDANI, R.; BROUGHTON, W.; HERNÁNDEZ, G.; KAMI, J.; LARIGUET, P.; MCCLEAN, P.; MELOTTO, M.; MIKLAS, P.; PEDROSA-HARAND, A.; PORCH, T.; SÁNCHEZ, F. Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: MOORE, P. H.; MING, R. (Ed.). **Genomics of tropical crop plants**. 1. ed. Berlin: Springer, 2008. p. 113–143.

GIANINAZZI, S. Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, n. 12, p. 1947–1955, 1996.

GIOVANNETTI, M.; BALESTRINI, R.; VOLPE, V.; GUETHER, M.; STRAUB, D.; COSTA, A.; LUDEWIG, U.; BONFANTE, P. Two putative-aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, n. 1, p. 186, 2012.

GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 53, n. 1-3, p. 131–146, 1997.

GRÜMBERG, B. C.; URCELAY, C. The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 51, n. 1, p. 1–10, 2015.

GUARDA, G.; PADOVAN, S.; DELOGU, G. Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 181–192, 2004.

GUSTAFSON, D. J.; CASPER, B. B. Differential host plant performance as a function of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities: Experimentally manipulating co-occurring *Glomus* species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 183, n. 2, p. 257–263, 2006.

GUTJAHR, C.; CASIERI, L.; PASZKOWSKI, U. *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. **New Phytologist**, Oxford, v. 182, n. 4, p. 829–837, 2009.

HARB, A.; KRISHNAN, A.; AMBAVARAM, M. M. R.; PEREIRA, A. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, n. 3, p. 1254–1271, 2010.

HSIAO, T. C. Measurements of plant water status. In: STEWART, B. A.; NIELSEN, D. R. (Ed.). **Irrigation of agricultural crops**. New York: ASA, 1990. p. 244–280.

HOLMBERG, N.; BÜLOW, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 61–66, 1998.

HOOKER, J. E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root system morphology. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, n. 2, p. 207–214, 1992.

HUNGRIA, M.; DE ANDRADE, D. S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, É. L. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho EM monocultura ou consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 8, p. 807–818, 1997.

ISAAC, S. Mutualistic symbioses. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Fungal-plant interactions**. 1. ed. London: Chapman & Hall Press, 1992. p. 266–316.

JANSA, J.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? **New Phytologist**, Oxford, v. 177, p. 779–789, 2008.

JEBARA, M.; AOUANI, M. E.; PAYRE, H.; DREVON, J. J. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus deficiency. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 3, p. 309–315, 2005.

JONES, A. L. **Phaseolus bean**: post-harvest operations. Rome: FAO/CIAT, 1999. (INPhO – Post-harvest Compendium). Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compndium\\_-\\_Phaesolus\\_beans.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Phaesolus_beans.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2012.

KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 109, p. 58–67, 1999.

KOIDE, R. T. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Oxford, v. 147, n. 2, p. 233–235, 2000.

KOTTKE, I.; SORO, A.; BERGER, A. **Untersuchungen zur Bedeutung der Stickstoffspeicherung in der Mykorrhiza für die Trockenstresstoleranz verschiedener Ökotypen der Buche**. Karlsruhe: LUBW - Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg, 1999.

KRAJINSKI, F.; BIELA, A.; SCHUBERT, D.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; KALDENHOFF, R.; FRANKEN, P. Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. **Planta**, Berlin, v. 211, n. 1, p. 85–90, 2000.

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

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 25, n. 2, p. 275–294, 2002.

LEVITT, J. (Ed.). **Responses of plants to environmental stresses**. 1. ed. Nova York: Academic Press, 1972. 697 p.

LIAO, H.; YAN, X.; RUBIO, G.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W.; LYNCH, J. P. Basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 31, n. 1, p. 959–970, 2004.

LYNCH, J.; WHITE, J. W. Shoot nitrogen dynamics in tropical common bean. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 2, p. 392–397, 1992.

MCCONNELL, M.; MAMIDI, S.; LEE, R.; CHIKARA, S.; ROSSI, M.; PAPA, R.; MCCLEAN, P. Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 121, n. 6, p. 1103–1116, 2010.

MIRANSARI, M.; BAHRAMI, H. A.; REJALI, F.; MALAKOUTI, M. J.; TORABI, H. Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressful effects of soil compaction on corn (*Zea mays* L.) growth. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 2014–2026, 2007.

NAVARRO-RÓDENAS, A.; BÁRZANA, G.; NICOLÁS, E.; CARRA, A.; SCHUBERT, A.; MORTE, A. Expression analysis of aquaporins from desert truffle mycorrhizal symbiosis reveals a fine-tuned regulation under drought. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 26, n. 9, p. 1068–78, 2013.

NELSON, D. E.; SHEN, B.; BOHNERT, H. J. Salinity tolerance — mechanistic models, and the metabolic engineering of complex traits. **Genetics and Engineering**, New York, v. 20, n. 1, p. 153-176, 1998.

NEUMANN, E.; GEORGE, E. The effect of arbuscular mycorrhizal root colonization on growth and nutrient uptake of two different cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotypes exposed to drought stress. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Abu Dhabi, v. 21, n. 2, p. 1–17, 2009.

ORFANOUDAKIS, M.; WHEELER, C. T.; HOOKER, J. E. Both the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* and *Frankia* increase root system branching and reduce root hair frequency in *Alnus glutinosa*. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 20, n. 2, p. 117–126, 2010.

ORTIZ, N.; ARMADA, E.; DUQUE, E.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 174, p. 87–96, 2015.

OUZIAD, F.; WILDE, P.; SCHMELZER, E.; HILDEBRANDT, U.; BOTHE, H. Analysis of expression of aquaporins and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 57, n. 1-2, p. 177–186, 2006.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 763–775, 2008.

PARRY, M. L.; CANZIANI, O. F.; PALUTIKOF, J. P.; van der LINDEN, P. J.; HANSON, C. E. **Climate Change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability**. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In: IPCC 2007. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Disponível em: <[http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/publications\\_ipcc\\_fourth\\_assessment\\_report\\_wg\\_2\\_report\\_impacts\\_adaptation\\_and\\_vulnerability.htm](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg_2_report_impacts_adaptation_and_vulnerability.htm)>. Acesso em: 15 maio 2012.

PENG, Y.; LIN, W.; CAI, W.; ARORA, R. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, Berlin, v. 226, n. 3, p. 729–740, 2007.

PORCEL, R.; AROCA, R.; AZCÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 60, n. 3, p. 389–404, 2006.

PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, n. 1, p. 181–200, 2012.

PORCEL, R.; AZCÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, n. 4, p. 211–221, out. 2004.

PORCEL, R.; AZCÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1933–1942, 2005.

PORCEL, R.; BAREA, J. M.; RUIZ-LOZANO, J. M. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, n. 1, p. 135–143, 2003.

PORCEL, R.; GÓMEZ, M.; KALDENHOFF, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Impairment of NtAQPI gene expression in tobacco plants does not affect root colonisation pattern by arbuscular mycorrhizal fungi but decreases their symbiotic efficiency under drought. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 15, n. 6, p. 417–423, 2005.

RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 127–136, 1998.

RAO, J. M.; BEEBE, S.; POLANIA, J.; RICAURTE, J.; CAJIAO, C.; GARCIA, R. Evaluation of drought resistance and associated traits. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Annual Report 2004. Project IP-1: Bean Improvement for the Tropics**. Cali: CIAT, 2004. p. 5-13.

RAPPARINI, F.; PEÑUELAS, J. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In: MIRANSARI, M. (Ed.). **Use of microbes for the alleviation of soil stresses**. 1. ed. New York: Springer, 2014. p. 21-42.

RECCHIA, G. H.; GREGORIO, D.; CALDAS, G.; LUIZA, A.; BERALDO, A. Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 4, p. 7155–7179, 2013.

REDECKER, D.; SCHÜSSLE, A.; STOCKINGER, H.; STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B.; WALKER, C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 23, n. 7, p. 515–531, 2013.

RODRIGUEZ-URIBE, L.; O'CONNELL, M. A. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1391–1398, 2006.

ROSALES-SERNA, R.; KOHASHI-SHIBATA, J.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; TREJO-LÓPEZ, C.; ORTIZ-CERECERES, J.; KELLY, J. D. Biomass distribution, maturity acceleration and yield in drought-stressed common bean cultivars. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 85, n. 2-3, p. 203–211, 2004.

ROUSSEL, H.; BRUNS, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; HAHLBROCK, K.; FRANKEN, P. Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. **Plant Science**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 203–210, 1997.

RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 13, n. 6, p. 309–317, 2003.

RUIZ-LOZANO, J. M.; AZCÓN, R.; PALMA, J. M. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, n. 2, p. 327–333, 1996.

RUIZ-LOZANO, J. M.; COLLADOS, C.; BAREA, J. M.; AZCÓN, R. Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2241–2242, 2001.

RUIZ-LOZANO, J. M.; PORCEL, R.; AROCA, R. Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? **New Phytologist**, Oxford, v. 171, n. 4, p. 693–698, 2006.

RUIZ-SÁNCHEZ, M.; AROCA, R.; MUÑOZ, Y.; POLÓN, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 11, p. 862–869, 2010.

SAIA, S.; AMATO, G.; FRENDIA, A. S.; GIAMBALVO, D.; RUISI, P. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production and nitrogen fixation of berseem clover plants subjected to water stress. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, e90738, 2014.

SANDERS, I. R.; CROLL, D. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, p. 271–292, 2010.

SHNEIDER, K. A.; BROTHERS, M. E.; KELLY, J. D. Marker assisted selection to improve drought resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 1, p. 51–60, 1997.

SHONE, M. G. T.; FLOOD, A. V. Effects of periods of localized water stress on subsequent nutrient uptake by barley roots and their adaptation by osmotic adjustment. **New Phytologist**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 561–572, 1983.

SHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. Preface. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali: CIAT, 1989.

SIEFRITZ, F.; TYREE, M. T.; LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A.; KALDENHOFF, R. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 869–876, 2002.

SINGH, S. P.; MUÑOZ, C. G. Resistance to Common Bacterial Blight among Phaseolus Species and Common Bean Improvement. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 1, p. 80–89, 1999.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, Kidlington, v. 9, n. 2, p. 214–219, 1998.

SLANKIS, V. Hormonal relationships in mycorrhiza. In: MARKS, G. C.; KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Ectomycorrhizae: their ecology and physiology**. 1. ed. New York: Academic Press, 1973. p. 213-298.

SOLAIMAN, M. Z.; SAITO, M. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. **New Phytologist**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 533–538, 1997.

SPONCHIADO, B. N.; WHITE, J. N.; CASTILLO, J. A.; JONES, P. G. Root growth of four common bean cultivars in relation to drought tolerance in environments with contrasting soil types. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 249-257, 1989.

STONE, L. F.; SARTORATO, A. **O cultivo do feijão: recomendações técnicas**. Brasília, DF: EMBRAPA, CNPAF, 1994. 83 p. (Documentos, 48).

TAJINI, F.; SURIYAKUP, P.; VAILHE, H.; JANSA, J.; DREVON, J.-J. Assess suitability of hydroaerobic culture to establish tripartite symbiosis between different AMF species, beans, and rhizobia. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 73, 2009.

TANG, C.; DREVON, J. J.; JAILLARD, B.; SOUCHE, G.; HINSINGER, P. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 260, n. 1-2, p. 59–68, 2004.

TCHABI, A.; COYNE, D.; HOUNTONDI, F.; LAWOUIN, L.; WIEMKEN, A.; OEHL, F. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in sub-Saharan Savannas of Benin, West Africa, as affected by agricultural land use intensity and ecological zone. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 18, n. 4, p. 181–195, 2008.

TOHME, J.; JONES, P.; BEEBE, S.; IWANAGA, M. The combined use of agroecological and characterisation data to establish the CIAT *Phaseolus vulgaris* core collection. In: van HINTUM, T. J. L.; BROWN, A. H. D.; SPILANE, C.; HODGKIN, T. (Ed.). **Core collection of Plant Genetic Resources**. 1. ed. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 95-107.

TORRES, G. A. M.; PFLIEGER, S.; CORRE-MENGUY, F.; MAZUBERT, C.; HARTMANN, C.; LELANDAIS-BRIÈRE, C. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. **Plant Science**, Shannon, v. 171, n. 3, p. 300–307, 2006.

TURJAMAN, M.; TAMAI, Y.; SANTOSO, E.; OSAKI, M.; TAWARAYA, K. Arbuscular mycorrhizal fungi increased early growth of two nontimber forest product species *Dyera polyphylla* and *Aquilaria filaria* under greenhouse conditions. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 16, n. 7, p. 459–464, 2006.

UEHLEIN, N.; FILESCHI, K.; ECKERT, M.; BIENERT, G. P.; BERTEL, A.; KALDENHOFF, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 68, n. 1, p. 122–129, 2007.

van SCHOONHOVEN, A.; YOVEST, O. (Ed.). Common beans: Research for crop improvement. 1. ed. Wallingford: CAB International/CIAT, 1991. 980 p.

WANG, W.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, n. 1, p. 1–14, 2003.

WATSON, R. T. **Climate Change 2001**: Summary for Policymakers Synthesis Report, Intergovernmental Panel on Climate Change. In: IPCC. San Jose, 2001. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/pdf/climate-changes-2001/synthesis-spm/synthesis-spm-en.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2012.

WHITE, J. W. Preliminary results of the the bean international drought yield trial (BIDYT). In: WHITE, J. W.; HOOGENBOOM, D.; IBARRA, F.; SINGH S. P. (Ed.). **Research on drought tolerance in common bean**. 1. ed. Cali: CIAT, 1988. p. 126-145.

WHITE, J. W.; SINGH, S. P. Sources and inheritance of earliness in tropically adapted indeterminate common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 55, n. 1, p. 15–19, 1991.

WHITE, J. W.; OCHOA, R. M.; IBARRA, F. P; SINGH, S. P. Inheritance of seed yield, maturity and seed weight of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under semi-arid rainfed conditions. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 263-273, 1994.

WU, J.; WANG, L.; LI, L.; WANG, S. De Novo Assembly of the Common Bean Transcriptome Using Short Reads for the Discovery of Drought-Responsive Genes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, e109262, 2014.

YAN, X.; LIAO, H.; BEEBE, S. E.; BLAIR, M. W.; LYNCH, J. P. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 265, n. 1-2, p. 17–29, 2004.

YANO, K.; YAMAUCHI, A.; KONO, Y. Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 6, n. 5, p. 409–415, 1996.

ZADRAŽNIK, T.; HOLLUNG, K.; EGGE-JACOBSEN, W.; MEGLIČ, V.; ŠUŠTAR-VOZLIČ, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 78, p. 254–272, 2013.

ZHU, J.-K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. a.; BOHNERT, H. J. Molecular Aspects of Osmotic Stress in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, v. 16, n. 3, p. 253–277, 1997.

### 3 INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO POR FMA SOBRE OS PADRÕES DE CRESCIMENTO RADICULAR E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE GENÓTIPOS DE FEIJOEIRO SUBMETIDOS A DÉFICIT HÍDRICO

#### Resumo

O feijoeiro é considerado, dentre as plantas leguminosas, a cultura com maior produção em todo o mundo. Entretanto, estima-se que cerca de 73% dessa produção na América Latina esteja localizada em áreas sujeitas a níveis moderados a severos de déficit hídrico. A presença de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) no solo pode influenciar a performance da planta sob situações de déficit hídrico. A melhor absorção de água e nutrientes no solo a partir de reservas inacessíveis ao sistema radicular resultam numa melhor hidratação das plantas, alterações em processos bioquímicos e metabólicos que conduzem para melhorias em padrões fisiológicos e na manutenção do crescimento e produtividade. No presente estudo, o modelo de interação feijoeiro – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*) foi adotado para se investigar tais processos. Seis genótipos de feijoeiro com diferentes históricos de melhoramento genético e níveis de tolerância à seca foram avaliados: IAC-Carioca 80SH e Rosinha G2 (suscetíveis), BAT 477, SEA-5, G 12873 (tolerantes) e G40111, um genótipo de *P. acutifolius* (tolerante). O modelo de experimentação do CIAT foi adaptado e um déficit hídrico gradual (15 dias) foi induzido em casa de vegetação. Com exceção de G 12873, todos os demais genótipos apresentaram um aumento nas taxas de colonização por FMA sob indução de déficit hídrico. Parâmetros relacionados a acúmulo de massa seca foliar e radicular foram os mais eficientes para contrastar os diferentes genótipos e tratamentos. A inoculação com FMA demonstrou ter efeito positivo sobre o crescimento radicular em ambas condições (tratado e controle) somente para BAT 477 e IAC-Carioca 80SH. Rosinha G2 e G12873 foram os únicos genótipos a demonstrarem um aumento na taxa de assimilação fotossintética em plantas inoculadas. A inoculação produziu aumentos significativos na taxa de condutância estomática e transpiração no genótipo SEA-5, e redução em G40111. Rosinha G2 apresentou um maior acúmulo de CO<sub>2</sub> em plantas inoculadas, sendo este fator inverso em G12873 e G40111. No geral, cada genótipo se beneficiou de maneira distinta da colonização dependendo do caractere avaliado, sendo que SEA-5 foi o único que se beneficiou da inoculação com FMA em todos os parâmetros fisiológicos analisados.

Palavras-chave: Déficit hídrico. Taxa de assimilação fotossintética. Condutância estomática. Crescimento radicular.

## Abstract

Among legumes, common bean is the crop with the greatest production in the world. However, it is estimated that around 73% of the cultivation areas in Latin America are located in regions subjected to moderate or severe water deficit episodes. The presence of AMF in the soil can influence plant's performance under water deficit regimes. A better water and nutrient absorption from the soil results in shifts on both biochemical e metabolic processes that leads to enhancements on physiological properties, growth maintenance and increased yield. In the present study, the interaction model common bean – AMF (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* and *Gigaspora rosea*) was adopted aiming to investigate such processes. Six common bean genotypes with both different histories of genetic improvement and drought tolerance capacity were selected: IAC-Carioca 80SH and Rosinha G2 (sensitive), BAT 477, SEA-5, G 12873 (tolerant) and G40111, a *P. acutifolius* genotype (tolerant). The CIAT (2012) model for experimentation was adopted and a gradual water deficit regime (15 days) was applied in greenhouse condition. With the exception of G 12873, all genotypes demonstrated an increase in AMF root colonization rates under water deficit influence. Parameters related to dry mass accumulation on roots and leaves were the more efficient in order to contrast genotypes and treatments. AMF colonization revealed a positive impact on root growth in both treatments (treated and control) for BAT 477 and IAC-Carioca 80SH only. Rosinha G2 and G12873 were the only genotypes to suffer an increase on photosynthetic assimilation rate in inoculated plants. Stomatal conductance and transpiration rates were induced under AMF inoculation only in SEA-5, and reduced in G40111. Rosinha G2 presented an enhanced CO<sub>2</sub> accumulation on inoculated plants, being this the opposite G 12873 and G40111. In general, each genotype benefitted in a distinct way according to the character evaluated, being SEA-5 the only one that benefitted from AM inoculation in all physiological parameters analysed.

Keywords: Water deficit. Photosynthetic assimilation rate. Stomatal conductance. Root growth.

### 3.1 Introdução

A redução na disponibilidade de água sob seca conduz a um padrão complexo de respostas caracterizado pela redução do potencial hídrico nos tecidos vegetais que conduz para uma série de modificações em diferentes processos da planta. Estas respostas dependem principalmente da intensidade do estresse, do genótipo da planta, e do estágio fenológico de desenvolvimento em que esta se encontra (ROSALES et al., 2012). Se os sintomas não são mitigados, a seca leva à interrupção do desenvolvimento reprodutivo, senescência foliar prematura, murcha, dessecação e morte (NEUMANN, 2008). Sob déficit hídrico, diminuição no conteúdo relativo de água (*relative water content* – RWC) e no potencial de água da folha induzem o fechamento estomático, acarretando uma redução na disponibilidade de CO<sub>2</sub>, e consequentemente, no declínio da taxa fotossintética ( $A_N$ ) e na eficiência do uso da água (*water use efficiency* – WUE) (BOTA; MEDRANO; FLEXAS, 2004).

A redução nos valores dos parâmetros fotossintéticos durante um episódio de seca é considerada a principal responsável pelo declínio da produção de matéria seca da planta (LAWLOR; TEZARA, 2009). Além disso, o declínio na absorção de carbono pelas folhas é seguido por uma alteração no particionamento dos produtos fotossintetizados por toda a planta, correspondendo em geral para um aumento na razão raiz:parte aérea (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Este é o resultado do declínio no desenvolvimento da parte aérea e a manutenção do crescimento radicular ante a diminuição da disponibilidade de água no solo (SHARP, 2002). Essa resposta é mediada pela ação integrada de diversas classes de fito-hormônios, dentre eles ABA e etileno (WILKINSON; DAVIES, 2010).

Para a cultura do feijoeiro o desbalanço no particionamento de carbono tem forte impacto nas taxas de abscisão floral, um importante determinante para a produção (CLEMENTS; ATKINS, 2001). Em culturas como o feijoeiro, em que a produção de sementes é um traço econômico importante, os principais critérios de seleção para a tolerância constituem parâmetros de crescimento e de produtividade (ACOSTA-GALLEGOS; ADAMS, 1991). Embora estes parâmetros reflitam a performance das plantas sob estresse, sua determinação é difícil e demanda tempo. Desta forma, a avaliação de cultivares através de parâmetros fisiológicos seria bastante útil para acelerar o processo de seleção de cultivares com potencial para tolerância à seca (LIZANA et al., 2006).

Lizana et al. (2006) indicou que, comparando duas cultivares de feijoeiro, Arroz e Orfeu, padrões superiores de tolerância acabaram sendo definidos pelo cultivar que apresentou uma maior plasticidade quando expostos à seca em termos de RWC, condutância estomática, taxa fotossintética, síntese de ABA e resistência a fotoinibição.

Rosales et al. (2012) indicaram que o alto potencial do cultivar tolerante Pinto-Salttillo em manter a produção de sementes sob condições terminais de déficit hídrico reside na capacidade de resposta rápida e com controle fino sob a condutância estomática, a difusão e fixação de CO<sub>2</sub>, por um uso mais eficiente da água e na capacidade de evitar o acúmulo de EROs.

Estudos ressaltam que o papel desempenhado pelas FMA na manutenção das relações hídricas do hospedeiro pode oferecer uma estratégia bastante interessante no sentido de melhorar a tolerância de plantas à seca. Os efeitos fisiológicos benéficos associados à simbiose com FMA incluem manutenção do potencial hídrico das folhas, do conteúdo relativo de água, condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub>, e eficiência do fotossistema II (AUGÉ, 2001; BÁRZANA et al., 2012). Diversos estudos têm demonstrado uma melhoria nas taxas de trocas gasosas (condutância estomática, transpiração e fotossíntese) em plantas micorrizadas sob condição de déficit hídrico, independentemente dos efeitos positivos sobre crescimento e qualidade nutricional (AUGÉ, 2001; RUIZ-LOZANO, 2003; SÁNCHEZ-BLANCO et al., 2004; LEE et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais a simbiose com FMA controlam estes parâmetros ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, estudos tem demonstrado que plantas colonizadas por FMA frequentemente apresentam uma menor concentração de ABA (DOUBKOVÁ; VLASÁKOVÁ; SUDOVÁ, 2013) e um maior potencial hídrico das folhas (PORCEL; RUIZ-LOZANO, 2004) evidenciando mecanismos interessantes de mitigação do efeito do déficit hídrico sobre o crescimento da planta. A simbiose com FMA pode conduzir também para uma maior eficiência fotoquímica do fotossistema II durante a condição de seca (RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Em combinação com parâmetros fisiológicos previamente discutidos, padrões de crescimento radicular como aumento na geração de raízes laterais e da densidade e proliferação radicular aumentando a superfície de contato e melhorando a absorção de água se configuram como estratégias importantes para a sobrevivência em ambientes de déficit hídrico (WHITE; KIRKEGAARD, 2010). Li et al. (2014), investigaram a importância de FMA e o desenvolvimento de raízes secundárias comparando dois cultivares de sorgo (*Hordeum vulgare*), um mutante (*brb*) incapaz de produzir raízes secundárias e um selvagem (*wt*), ambos colonizados por *R. intraradices*. Os experimentos indicaram que a presença de FMA pode quase que totalmente compensar a ausência de raízes secundárias na planta sob condições de déficit hídrico (LI et al., 2014). Além disso, a concentração de P, o potencial hídrico da folha, a taxa fotossintética, a transpiração, a condutância estomática, e a eficiência no uso da água, foram significativamente aumentadas na presença da FMA, mas não na ocorrência de raízes laterais.

Neste trabalho, parâmetros relacionados ao crescimento radicular, massa seca de raízes e folhas, conteúdo relativo de água, medições de trocas gasosas e assimilação fotossintética foram utilizados para caracterizar o modelo de interação feijoeiro – FMA durante a ocorrência de um déficit hídrico gradual (15 dias) no estágio de desenvolvimento R5 (pré-floração) das plantas. Os genótipos de feijoeiro BAT 477, IAC-Carioca 80SH, Rosinha G2, G 12478, SEA-5 e G40111, este último um genótipo de *P. acutifolius* especialmente adaptado a regiões secas, foram selecionados. O experimento foi realizado em casa de vegetação, seguindo recomendações do CIAT e adaptando o método previamente desenvolvido por Rao (2006).

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Desenho experimental e ensaio de déficit hídrico

Foram selecionados seis genótipos de feijoeiro contrastantes quanto a capacidade de tolerância a déficit hídrico: IAC-Carioca 80SH e Rosinha G2, tidos como moderadamente suscetíveis, dois genótipos tolerantes com o mesmo histórico de melhoramento genético, G 12873, uma linhagem selvagem, BAT 477 e SEA-5, além de G40111, genótipo de *P. acutifolius*, tidos como modelo de tolerância a déficit hídrico. O experimento foi instalado em Casa de Vegetação (Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, Piracicaba, SP – Brasil) entre os dias 24/02/2014 e 04/04/2014. O experimento foi constituído em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. Quatro tratamentos foram aplicados: (i) plantas inoculadas sob déficit hídrico (myc+/seca); (ii) plantas inoculadas controle irrigado (myc+/controle); (iii) plantas não-inoculadas sob déficit hídrico (myc-/seca); (iv) plantas não-inoculadas controle irrigado (myc-/controle).

O plantio das sementes foi realizado em tubos de PVC 90 cm x 10 cm de acordo com os princípios do método desenvolvido no CIAT (RAO, 2006) ideal para a manutenção da capacidade de campo de feijoeiro que é de 80%. As tampas dos tubos na superfície inferior foram furadas para facilitar o escoamento de água e preenchidas com uma camada de 3 cm de brita. Como substrato foi utilizada uma mistura de areia e vermiculita 2:1, lavada e esterilizada em auto-clave por 30 min a 120 atm. A inoculação com FMA (mistura contendo esporos e partes de hifas de *G. clarum*, *A. scrobiculata* e *G. rosea*) foi conduzida no momento do plantio da semente, sendo que 50 ml do substrato obtido das culturas armadilhas (2:1 areia e vermiculita) foram depositados no centro de cada vaso para os tratamentos inoculados. Os tratamentos não-inoculados receberam 50 ml do mesmo substrato, porém previamente esterilizado. O modelo de cultivo armadilha dos inóculos de FMA adotado em nossos

experimentos encontra-se descrito no Anexo A. A Figura 3.1 ilustra a disposição dos vasos e dos blocos na casa de vegetação.

De acordo com as especificações do método desenvolvido no CIAT (RAO, 2006), os formatos dos vasos de PVC permitem a simulação da capacidade de campo ideal para a cultura de feijoeiro que é de 80%, já que impedem a evaporação excessiva graças ao menor diâmetro. Os tubos foram pesados contendo apenas substrato seco, posteriormente saturados com H<sub>2</sub>O deionizada (até o início do escoamento) e novamente pesados. Para cada bloco, foi possível então calcular o volume de água para manter a saturação dos vasos (em média 200 ml ao dia). Este procedimento foi repetido periodicamente para considerar o crescimento das plantas.

O ensaio de déficit hídrico foi caracterizado por uma interrupção gradual na irrigação afim de se aproximar o máximo possível das condições encontradas no campo. O corte na irrigação foi iniciado decorridos 28 dias do início do experimento. Após a última rega de 200 ml de água, 20 ml foram adicionados na superfície dos vasos decorridos três dias de déficit hídrico, seguidos por mais 50 ml decorridos seis, nove e doze dias.

Foram realizadas três aplicações com solução nutritiva de Hoagland adaptada (para formulação ver Anexo A - Tabela Suplementar A.1) (HOAGLAND; ARNON, 1950). A primeira rega foi feita após dez dias com solução completa para todos os vasos, seguida por outra rega com solução completa após sete dias. A terceira rega foi efetuada sete dias após a segunda, desta vez com solução de Hoagland com deficiência de fósforo para os tratamentos inoculados. Água deionizada foi utilizada para a manutenção das culturas durante todo o experimento.

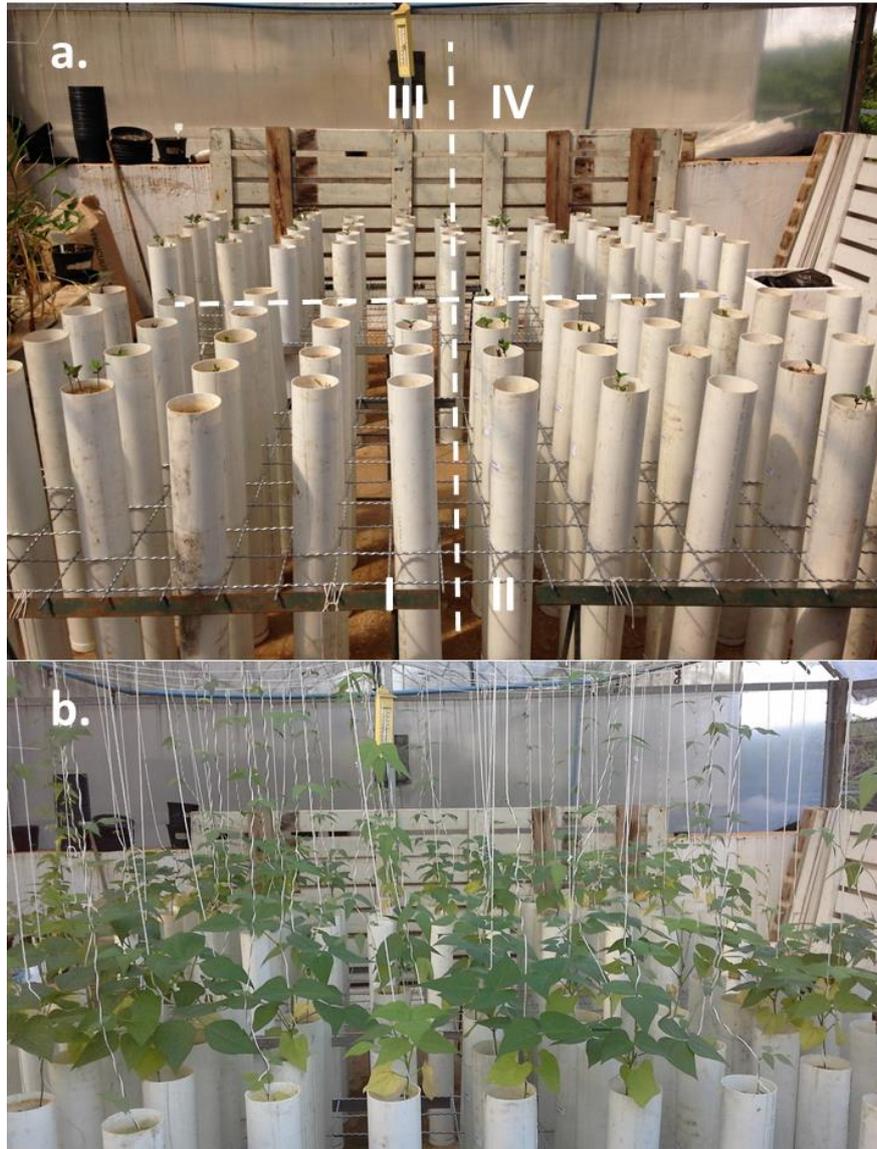


Figura 3.1 – Ensaio para análise dos efeitos do déficit hídrico sob o modelo de interação feijoeiro – FMA em casa de vegetação. a. Disposição dos vasos e dos quatro blocos inteiramente casualizados. b. Plantas decorridos 28 dias de experimentação sob condições ótimas de temperatura e mantidas a capacidade de campo a 80%.

### 3.2.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas

Para o cálculo do comprimento radicular, uma placa quadriculada com 1 cm de lado foi utilizada para fotografar raízes recém coletadas. ImageJ 1.46r ([HTTP://imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij)) foi usado para determinar o comprimento de cada raiz. Quinze medidas foram tomadas para cada raiz. A densidade de comprimento radicular foi expressa como a razão entre o comprimento da raiz e o volume de solo contido em cada vaso ( $\text{cm}/\text{cm}^3$ ).

Para o cálculo da massa seca de raiz e folha, raízes e folhas foram coletadas de cada uma das plantas, pesadas para a coleta do peso fresco, colocadas em sacos de papel e mantidas

em estufa ventilada a 60°C até atingirem peso constante (em média 2 dias). Posteriormente, foram pesadas novamente para a obtenção dos valores de massa seca.

Para a determinação do conteúdo relativo de água (RWC), um folíolo completamente expandido foi destacado da altura de inserção do terceiro ou quarto nó de cada planta. O período de coleta dos folíolos foi das 8 às 10 da manhã, para evitar efeitos de perda por evapotranspiração. Para todos os folíolos obteve-se a massa fresca (Mf). Posteriormente, as folhas foram totalmente imersas em água deionizada por 5 horas e pesadas seguindo a exata ordem de coleta para a obtenção da massa túrgida (Mt). Todas as amostras foram mantidas em estufa ventilada a 65°C por 48 h e pesadas para a determinação da massa seca (Ms). O RWC foi calculado de acordo com Barrs e Weatherley (1962) seguindo a equação:  $RWC (\%) = [(Mf - Ms) / (Mt - Ms)] * 100$ .

Para as análises de trocas gasosas e taxa de assimilação fotossintética foi utilizado o aparelho IRGA, modelo LI-6400XT. As leituras foram conduzidas entre 11 h da manhã as 1:30 da tarde, sob sol constante e seguindo a disposição das bancadas (orientação leste/oeste). Concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> (Ca) (~386  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), temperatura ~28 °C, umidade ambiente, radiação fotossintetizante ativa (PAR) constante (1000  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Os parâmetros extraídos dessa análise foram os seguintes:

- Taxa de assimilação fotossintética líquida (An),
- Condutância estomática (Gs),
- Concentração interna (intercelular) de CO<sub>2</sub> (Ci),
- Taxa de transpiração (E),
- Déficit de pressão de vapor na superfície foliar (vpdl).

Todos os dados coletados foram analisados utilizando o programa computacional *JMP – Statistical Discovery™ From SAS* e o pacote Laercio, em R versão 3.2.2 (<https://www.r-project.org/>). Análises de ANOVA foram utilizadas para contrastar os diferentes parâmetros analisados quanto a diferenças obtidas referentes aos blocos, tratamentos, genótipos e a interação tratamento/genótipo. Médias com valores diferentes entre os tratamentos e/ou genótipos ( $F < 0.05$ ) foram submetidos à avaliação complementar por teste de Tukey usando o pacote Laercio em R. Análise multivariada discriminante ou canônica foi utilizada para distinguir os genótipos em função dos tratamentos e vice-versa, a partir de componentes definidos por todas as variáveis agrupadas.

### 3.2.3 Taxa de colonização das plantas por FMA

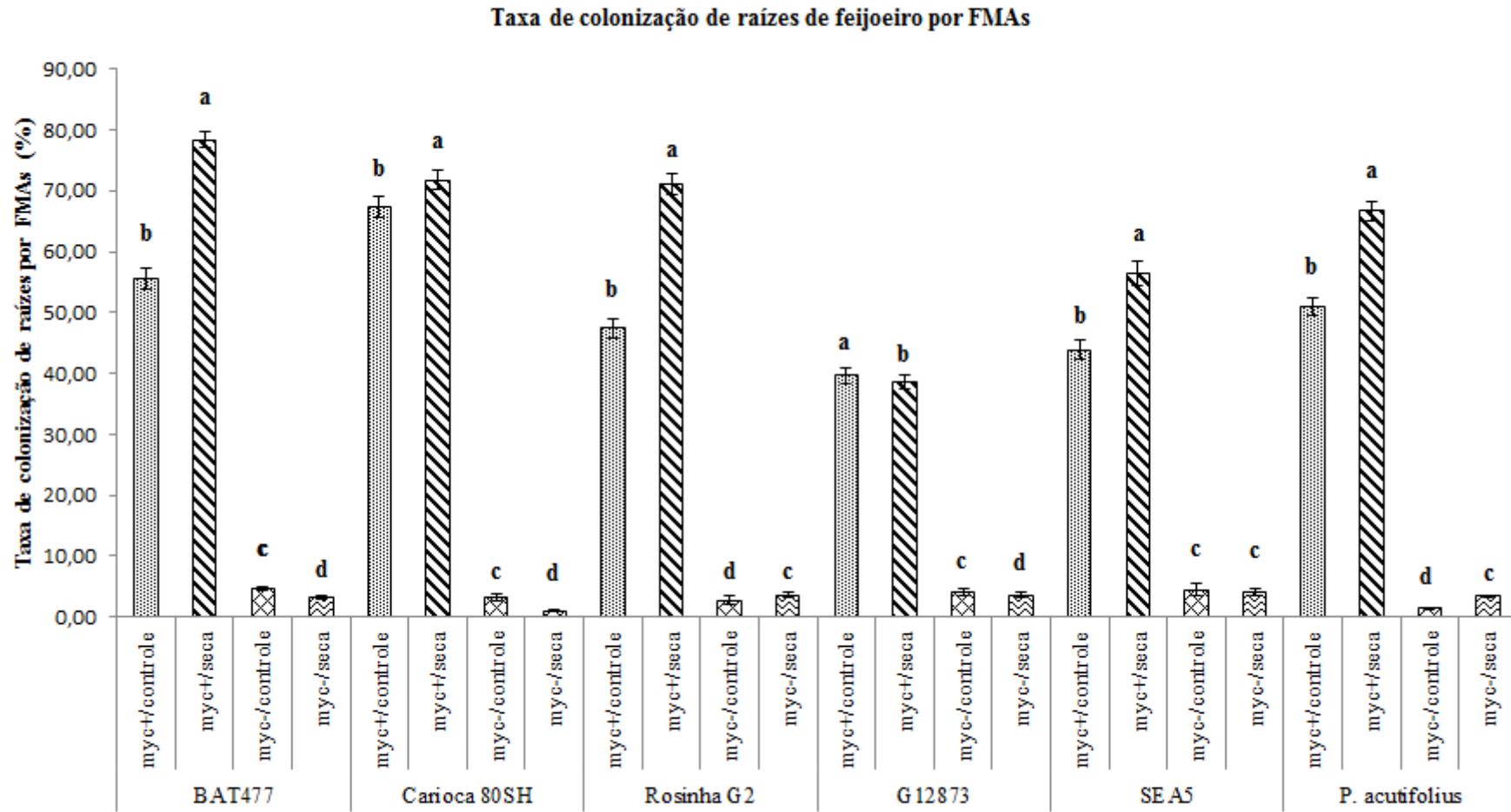
Para detalhes acerca do procedimento da contagem dos pontos de colonização e estimativas das taxas de colonização de raízes ver Anexo A – Figura Suplementar A.1, A.2 e A.3.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Taxa de colonização das plantas de feijoeiro por FMA

Variações relativas à porcentagem de colonização das plantas por FMA eram esperadas em virtude dos históricos distintos de melhoramento genético de cada um dos genótipos avaliados. O resultado do teste F aplicado sobre os valores da soma dos quadrados médios apontam um valor de F igual a  $6,8 \times 10^{-14}$  ( $p < 0,0001$ ), indicando uma alta influência do genótipo sobre as variações observadas. O tratamento de déficit hídrico também demonstrou influência significativa sobre as taxas de colonização das plantas por FMA,  $2 \times 10^{-16}$  ( $p < 0,0001$ ). O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) aplicado sobre os valores médios obtidos para cada tratamento confirmou as diferenças significativas observadas para as condições de estresse e controle (Figura 3.2). As taxas de colonização por FMA observadas nos tratamentos controle não-inoculados (Myc-) podem refletir um viés da técnica adotada.

Considerando-se os valores médios de taxa de colonização para cada genótipo e tratamento analisados, excetuando-se G12873, todos os demais genótipos apresentaram uma maior taxa de colonização sob indução de déficit hídrico (Figura 3.2). Uma maior indução no nível de colonização por FMA em plantas sob déficit hídrico já haviam sido apontadas em estudos similares (ABDELMONEIM et al., 2014). Os efeitos da dessecação do solo sobre o comportamento dos simbiontes FMA foram extensivamente revisados em uma meta-análise conduzida por Augé (2001). A grande maioria dos trabalhos consistiam em experimentos conduzidos em vasos e de curta duração de forma semelhante ao nosso, e em cerca de metade deles a seca afetou de forma significativa os níveis de colonização das culturas, aumentando muito mais do que diminuindo.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.2 - Taxa de colonização (%) de raízes de feijoeiro por mistura de FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*). Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

BAT 477 foi o genótipo que apresentou maior taxa de colonização pelos inóculos selecionados de FMA (78,63% para o tratamento myc+/strss). IAC-Carioca 80SH e Rosinha G2 também apresentaram taxas elevadas de colonização por FMA durante a ocorrência do déficit hídrico, 72,03% e 71,23% respectivamente, seguidos por G40111 (*P. acutifolius*) a 66,92%. Os genótipos SEA-5 e G12873 foram os que apresentaram menores valores médios de colonização por FMA durante o regime de déficit hídrico, com 56,73% e 39,83% respectivamente, sendo que fatores associados aos históricos de melhoramento e adaptação às espécies de FMA adotadas podem estar associados às taxas reduzidas de colonização. No geral, as taxas de colonização por FMA observadas não correspondem necessariamente ao potencial de tolerância à seca do genótipo selecionado, IAC-Carioca 80SH e Rosinha G2 são considerados de suscetíveis a moderadamente tolerantes, enquanto que SEA-5 é considerado tolerante ao déficit hídrico.

Sob condição controle irrigado, IAC-Carioca 80SH apresentou uma taxa de colonização por FMA (67,53%) maior do que a evidenciada para BAT 477 (55,73%). Embora estes valores fossem esperados para IAC-Carioca 80SH (IBIJIJEN et al., 1996; LAMBAIS; RIOS-RUIZ; ANDRADE, 2003), o genótipo possui histórico local de melhoramento e todas as espécies de FMA selecionadas são de fato bastante abundantes em solos do estado de São Paulo, os dados referentes a BAT 477 foram bastante satisfatórios visto o histórico de melhoramento da cultura visando uma melhor absorção de fósforo e tolerância à seca, traços comumente favorecidos pela associação com FMA (LYNCH; WHITE, 1992; TANG et al., 2004; JEBARA et al., 2005; BEEBE et al., 2013, TAJINI et al., 2009).

### 3.3.2 Parâmetros de crescimento

Níveis ótimos de partição de matéria seca entre as raízes e a parte aérea das plantas, e a consequente distribuição dessa matéria seca entre os órgãos vegetativos e reprodutivos da planta é de importância crucial para a produção da cultura sob déficit hídrico (RAUF; SADAQAT, 2007). Considerando-se a escolha dos genótipos sobre ambos os parâmetros massa seca foliar (MSF) e massa seca radicular (MSR), a razão dos valores de  $F$  obtidos sobre os valores da soma dos quadrados médios foram 302,27 e 205,93 respectivamente ( $p < 0,0001$ ), demonstrando uma influência significativa dos genótipos sobre as variações observadas nestes parâmetros. Os tratamentos seca e controle, inoculado e não-inoculado, também exerceram um efeito significativo sobre as variações observadas em MSF e MSR, 310,68 e 227 respectivamente ( $p < 0,001$ ).

Considerando-se o parâmetro MSF, à exceção de Rosinha G2 e G12873, todos os demais genótipos apresentaram um maior acúmulo de massa seca nas plantas inoculadas com FMA (Myc+) em relação aos seus respectivos controles (Myc-) quando sobre irrigação regular (ctrl), sendo esta afirmação corroborada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) aplicado sobre os valores médios obtidos para cada tratamento e genótipos (Figura 3.3). O teste de Tukey não revelou diferenças significativas a  $p < 0,05$  para os tratamentos de déficit hídrico (Figura 3.3). No geral, todos os genótipos apresentaram um aumento de MSF na condição controle em relação ao estresse, sendo que as únicas exceções se referem ao tratamento BAT 477 não-inoculado (Myc-) e para ambos os tratamentos de inoculação em G12873. Os genótipos BAT 477, IAC-Carioca 80SH e G40111 não apresentaram diferenças significativas no acúmulo de MSF entre os tratamentos Myc+/strss e Myc-/ctrl indicando um possível mecanismo pelo qual as FMA influenciem no processo de tolerância destes genótipos à seca. Os maiores valores de MSF foram obtidos para o tratamento myc+/ctrl, sendo Rosinha G2 e G40111 aqueles com maiores taxas, 3,47g e 3,27g respectivamente; SEA-5 (3,07g) e IAC-Carioca 80SH (3,01g) também apresentaram valores bastante próximos. Apesar de apresentar os maiores valores de MSF, Rosinha G2 foi o único genótipo que não apresentou diferenças significativas em relação à inoculação por FMA.

Durante o déficit hídrico, as plantas tendem a expressar uma maior translocação de produtos fotoassimilados para as raízes como parte de um mecanismo que assegura taxas superiores de crescimento do órgão e, conseqüentemente, o acesso a reservas ainda não exploradas de água no solo (SHARP et al., 2002). Entretanto, teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) aplicado sobre os valores médios obtidos para cada tratamento e genótipos revelou que apenas BAT 477, IAC-Carioca 80SH e Rosinha G2 (este último somente comparando-se ambos os tratamentos Myc-) apresentaram um aumento significativo no MSR durante o estresse (Figura 3.4).

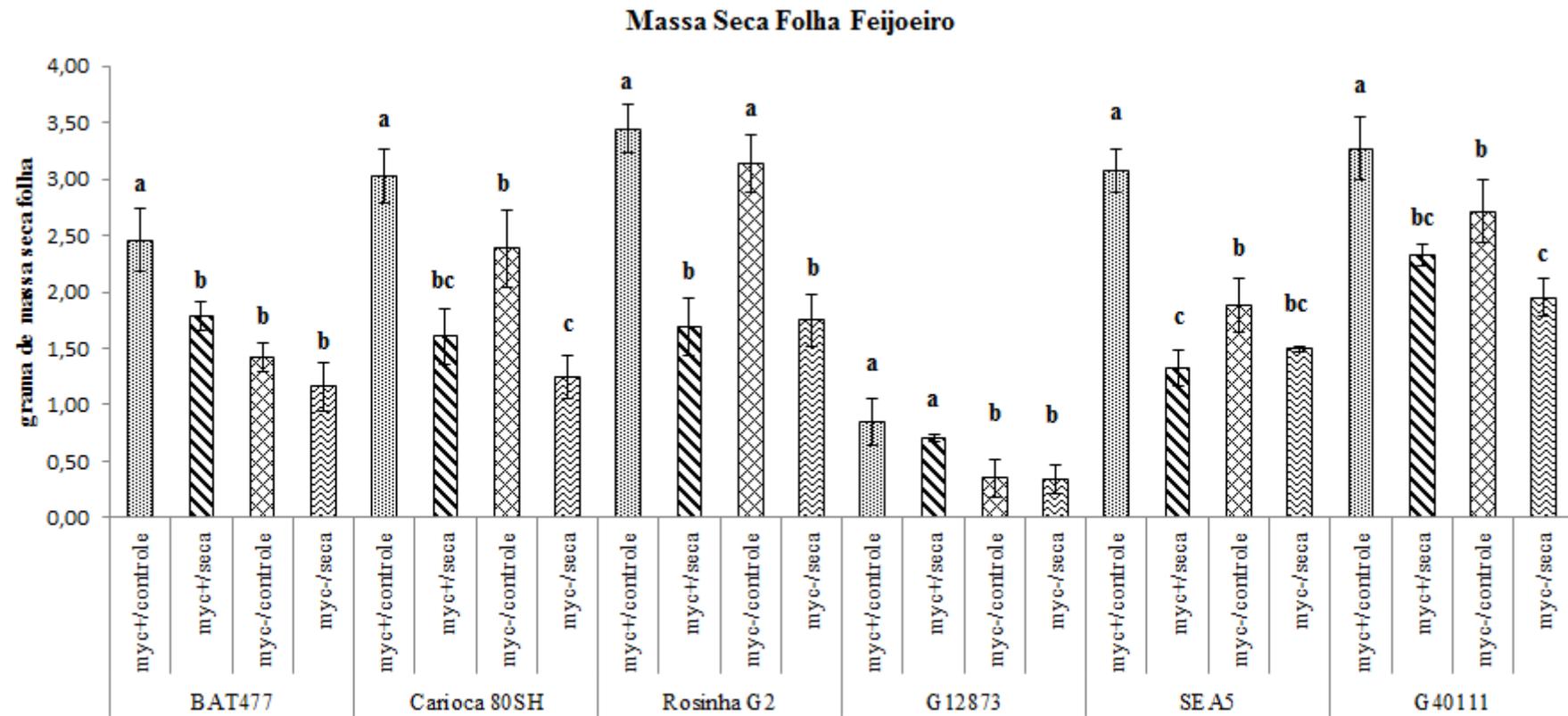
Quando sob interação com FMA, mesmo durante a seca, quando os recursos se tornam limítrofes, as plantas acabam por exibir um menor particionamento de subprodutos da fotossíntese assegurando dessa forma o crescimento e a produtividade da parte aérea das plantas, além é claro de serem comprovadamente responsáveis por um melhor estado nutricional das plantas, o que poderia sustentar também maiores níveis de MSF (Figura 3.3) (RAPPARINI; PEÑUELAS, 2013). Neste trabalho, G40111 foi o único genótipo que apresentou diferença significativa no acúmulo de MSR durante a inoculação com FMA em ambas as condições de irrigação analisadas (Figura 3.4), sendo que SEA-5 também apresentou um maior acúmulo de MSR quando sob inoculação com FMA e irrigação regular. Rosinha G2

foi o único genótipo a exibir maior acúmulo de MSR durante o estresse em plantas não-inoculadas, sendo que esta diferença foi de 4,64 vezes.

Os genótipos que apresentaram o maior acúmulo de MSR foram respectivamente Rosinha G2 e IAC-Carioca 80SH, com 8,12g e 7,5g respectivamente, durante o estresse em plantas não-inoculadas. Estes genótipos são aqueles considerados os mais suscetíveis ao déficit hídrico no trabalho e o maior acúmulo de MSR pode ser um dos motivos. Em ambos os casos, conforme descrito anteriormente para Rosinha G2, a inoculação com FMA foi responsável por diminuir o acúmulo de MSR nesses genótipos, sendo que para IAC-Carioca 80SH essa redução foi de 1,4 vezes. Para os demais genótipos, com níveis de moderado a alto de tolerância a déficit hídrico, embora a micorrização com FMA tenha conduzido a um maior acúmulo médio de MSR, a manutenção de níveis também mais elevados de MSR podem indicar um mecanismo auxiliar de tolerância à seca.

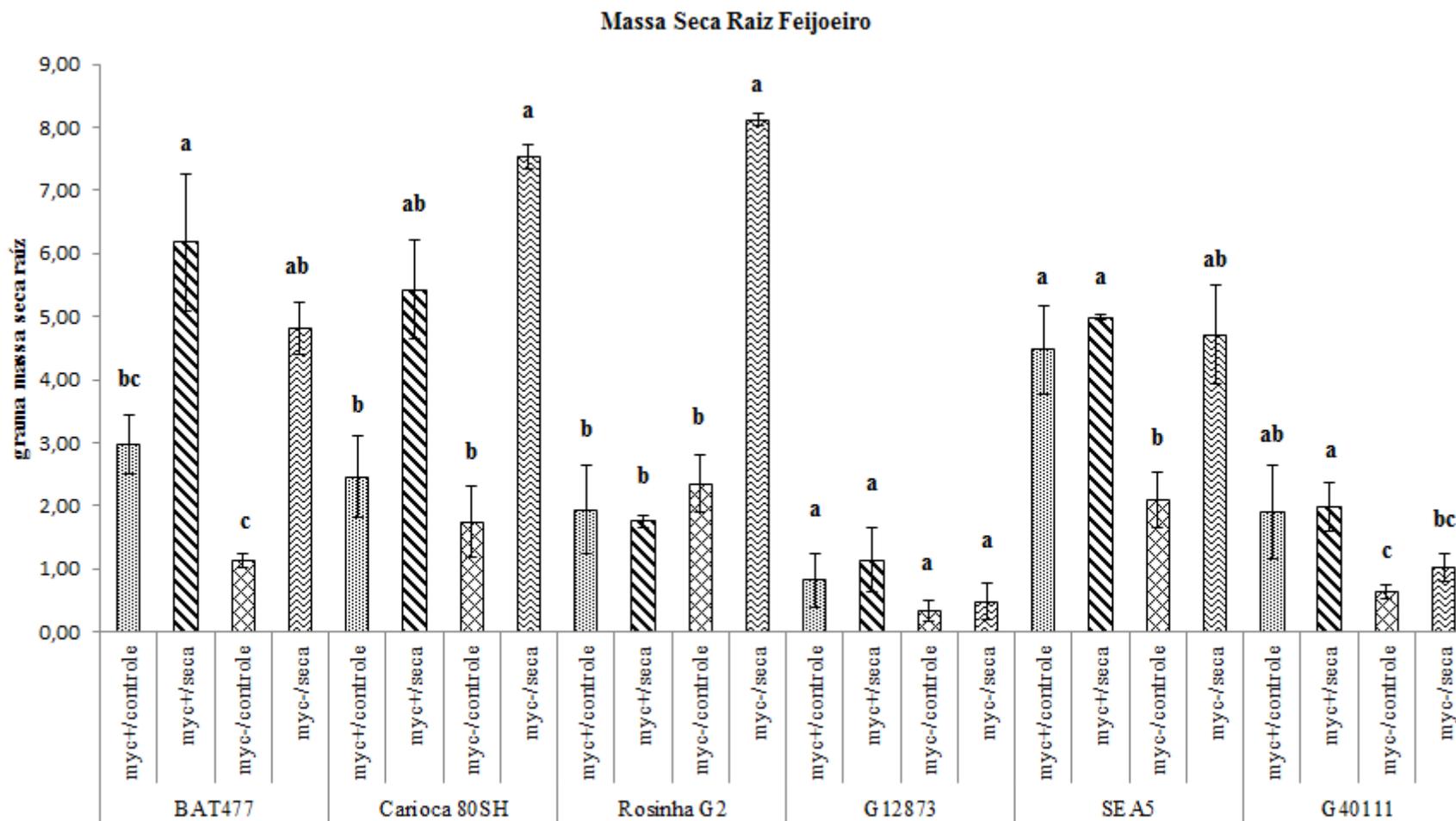
Considerando-se os valores médios de densidade de crescimento radicular obtidos, embora o valor médio de  $f$  para o fator genótipo tenha sido de 11,37 ( $p < 0,0001$ ), pouca ou nenhuma variação foi encontrada entre os tratamentos tomando-se cada genótipo isoladamente (Figura 3.5). A análise do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) indica um aumento significativo na densidade de crescimento radicular somente para a condição inoculado sobre irrigação constante (myc+/ctrl) nos genótipos BAT 477 e IAC-Carioca 80SH. Rosinha G2 também apresentou um aumento significativo no crescimento radicular, porém para o tratamento não inoculado (myc-/ctrl). Os demais genótipos, SEA-5, G 12873 e G40111, não demonstraram variação significativa entre os tratamentos analisados.

A capacidade de FMA em estimular o crescimento radicular em plantas através principalmente da regulação da biossíntese do hormônio vegetal auxina já foi extensamente revisada (BERTA et al., 1990; BERTA; TROTTA; FUSCONI, 1995; HOOKER; MUNRO; ATKINSON, 1992; GIANINAZZI, 1996; YANO; YAMAUCHI; KONO, 1996; GUTJAHR; CASIERI; PASZKOWSKI, 2009; ORFANOUDAKIS; WHEELER; HOOKER, 2010). Em nossas análises, a inoculação com FMA demonstrou ter efeito positivo sobre o crescimento radicular somente para BAT 477 e IAC-Carioca 80SH que apresentaram valores similares para as condições myc+/strss e myc-/ctrl.



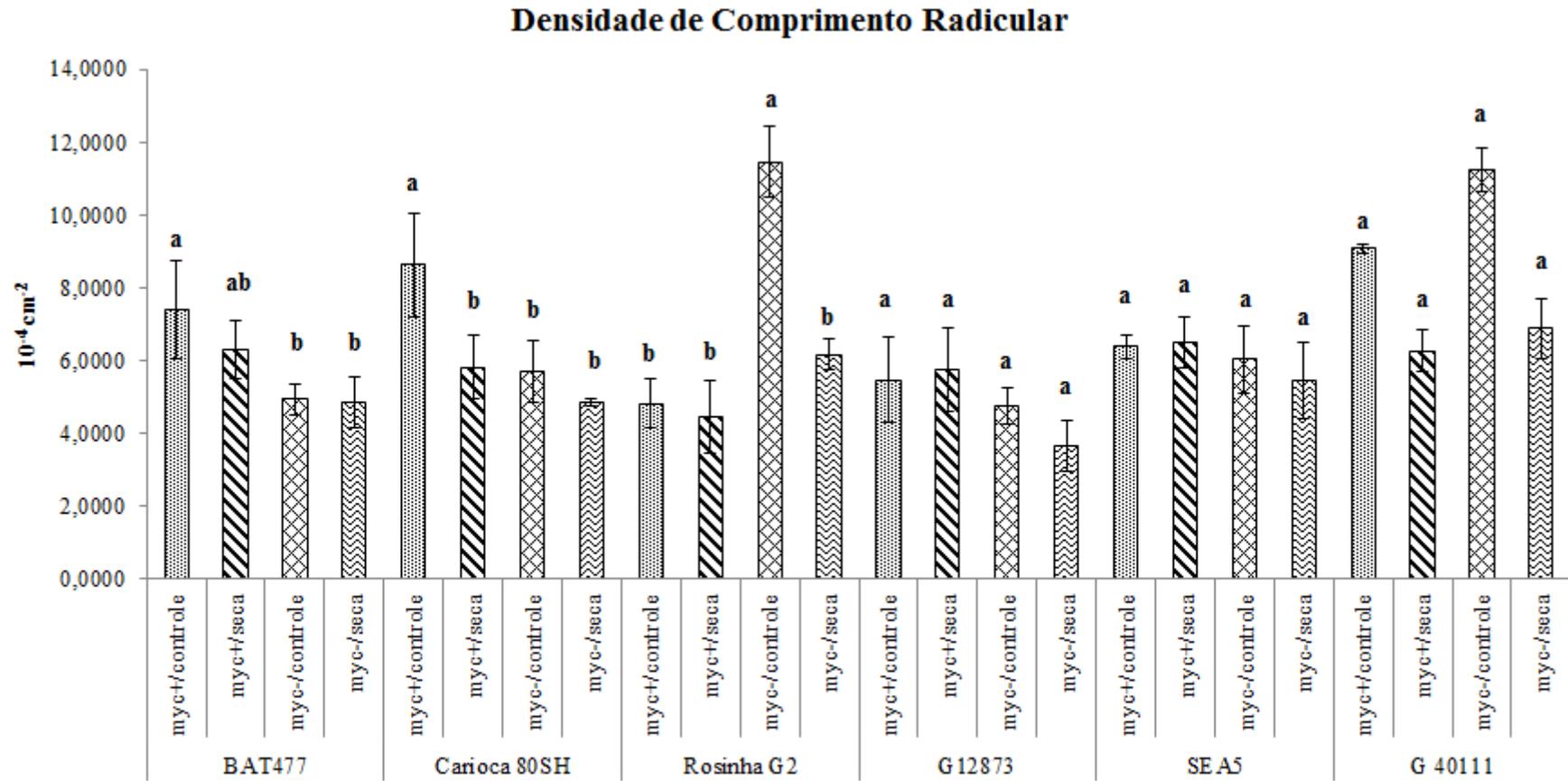
\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.3 - Massa seca (em gramas) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.4 - Massa seca (em gramas) de raízes de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.5 – Densidade de Comprimento Radicular ( $10^{-4} \text{ cm}^{-2}$ ) de raízes de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

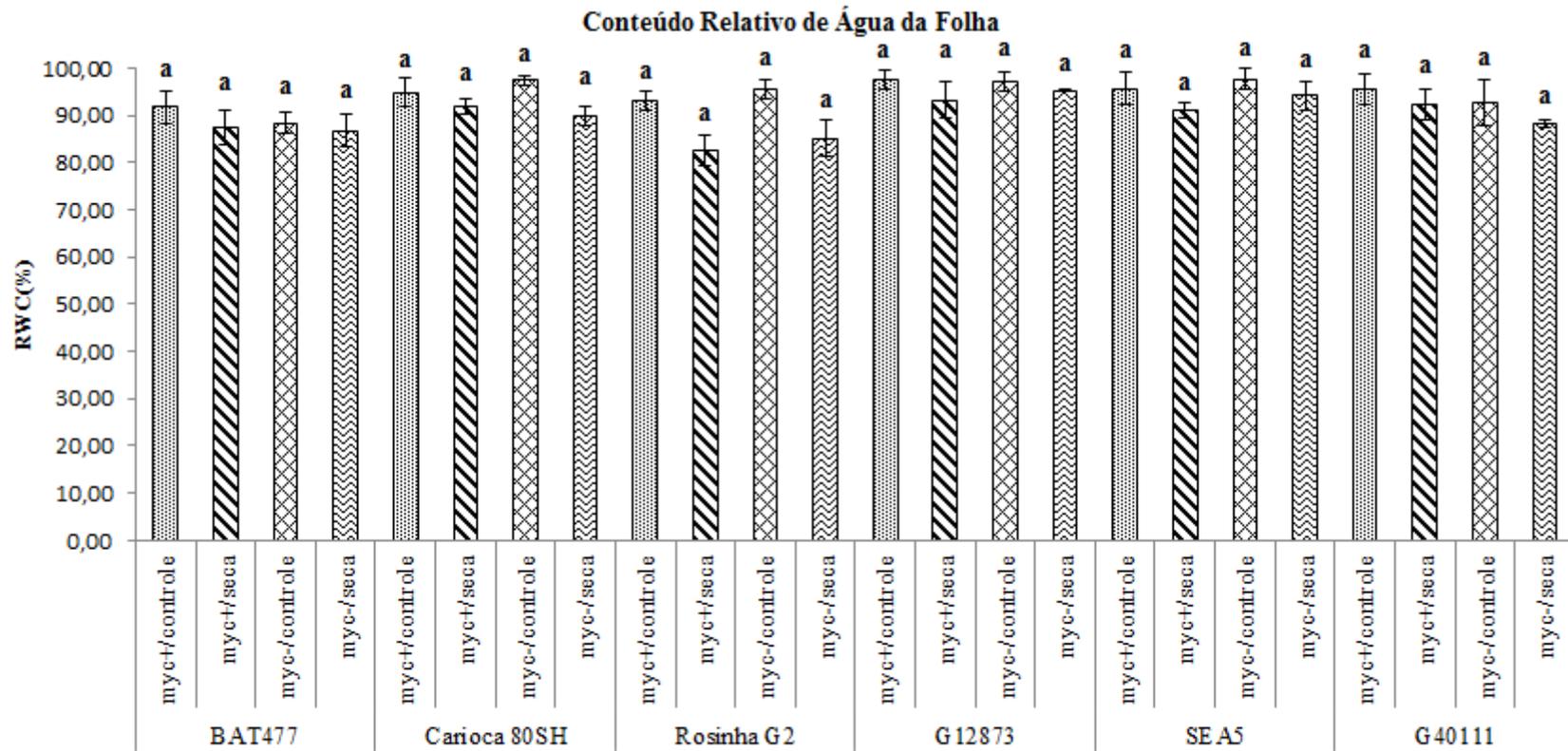
### 3.3.3 Relações hídricas da folha

O ajuste osmótico é um importante mecanismo de conservação da hidratação celular em plantas sob efeito de seca, e o conteúdo relativo de água pode ser utilizado para expressar o efeito do ajuste osmótico em folhas sob condições de baixo potencial hídrico (BLUM, 2005). Este parâmetro vem sendo extensivamente empregado como um eficiente marcador fisiológico para a validação das condições de experimentação envolvendo ensaios de déficit hídrico (BLUM, 2005; ROSALES et al., 2012). Os valores de  $F$  de indicam pouca variação significativa entre os genótipos ( $5,18 - p < 0,0004$ ) e entre os diferentes tratamentos ( $6,2 - p < 0,0009$ ). O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) não evidencia nenhuma diferença significativa entre os valores de RWC obtidos dentre os tratamentos analisados para cada genótipo (Figura 3.6). Os valores elevados obtidos para os tratamentos de seca estão relacionados à manutenção gradual do déficit hídrico, em detrimento de uma suspensão mais severa de irrigação como demonstrado por Lizana et al. (2006).

Interessante notar que embora os genótipos não tenham evidenciado variações individuais significantes entre os valores de RWC, IAC-Carioca 80SH, tido como um cultivar suscetível apresentou valores superiores ao do genótipo tolerante BAT 477 (91,99% e 88,45% respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos e indicam que RWC pode ser muito mais um produto derivado de  $G_s$  (condutância estomática) do que uma característica determinante para a tolerância à seca em plantas (RAMIREZ-VALLEJO; KELLY, 1998; ROSALES et al., 2012).

### 3.3.4 Parâmetros Fisiológicos da Planta

De acordo com Chaves, Flexas e Pinheiro (2009), a progressão do déficit hídrico em plantas conduz para a redução nas taxas de transpiração ( $E$ ) e de condutância estomática ( $G_s$ ), que diminuem a disponibilidade de  $CO_2$  ( $C_i$ ) nas plantas e afetam de forma negativa a fotossíntese ( $A_n$ ). A planta necessita equilibrar dois fatores que ocorrem simultaneamente: conservar água e assimilar  $CO_2$  atmosférico. À medida em que a disponibilidade de água no solo diminui, a taxa de transpiração decresce como resultado do fechamento dos estômatos. Consequentemente, a disponibilidade de  $CO_2$  atinge níveis extremamente reduzidos, restringindo o influxo deste componente nas células do mesófilo e, assim, a planta utiliza o  $CO_2$  proveniente da respiração para manter um nível mínimo de taxa fotossintética (RAVEN; REVERT; EICHHORN, 2001).



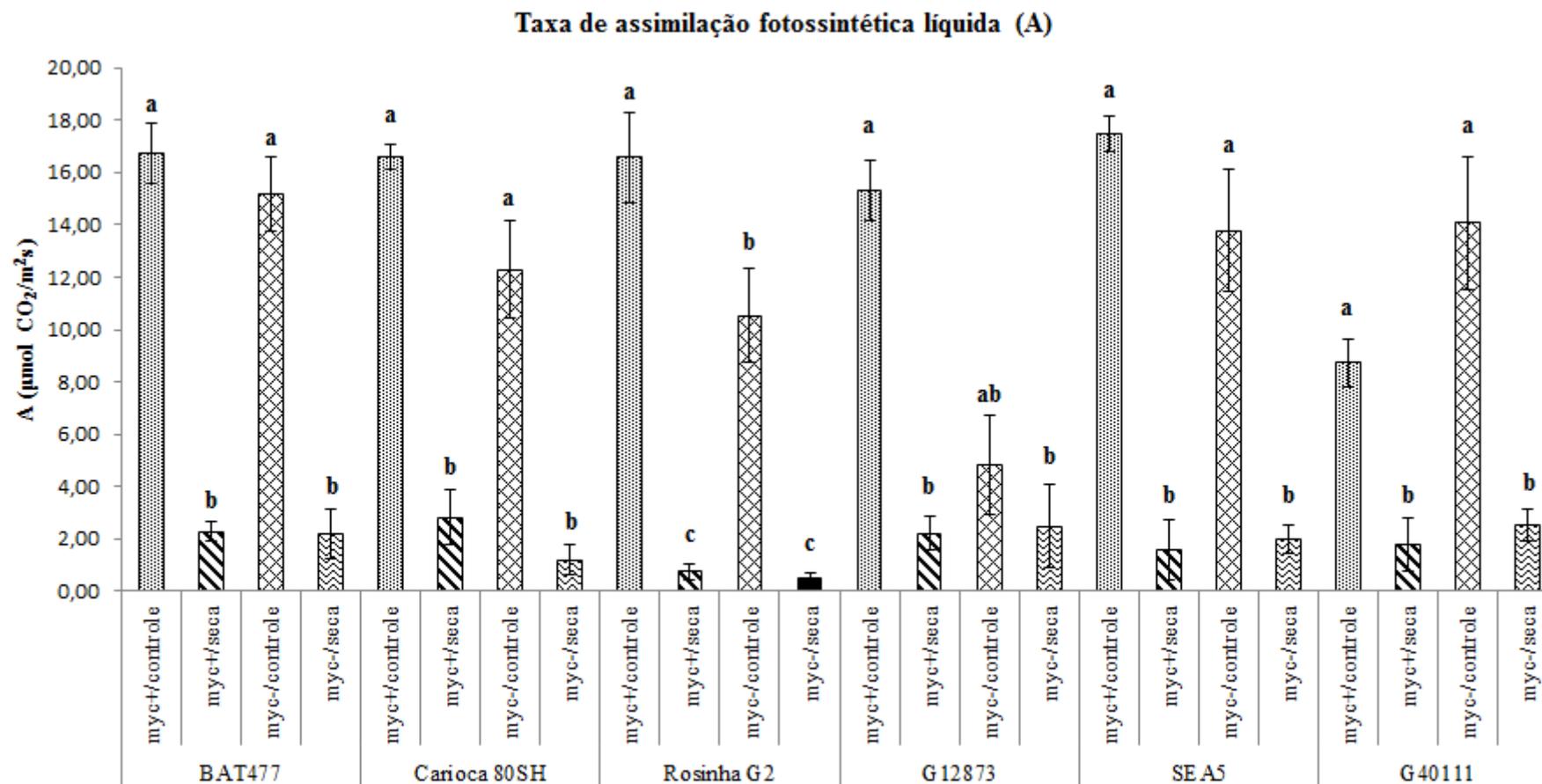
\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.6 - Conteúdo relativo de água (RWC(%)) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

Os efeitos fisiológicos da simbiose com FMA incluem modificações nas relações hídricas e nas condições fisiológicas da parte aérea das plantas, principalmente em termos de potencial hídrico da folha, condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub>, e eficiência do fotossistema II (AUGÉ, 2001; BARZANA et al., 2012). Diversos estudos demonstraram um aumento nas taxas de trocas gasosas (condutância estomática, transpiração e taxas fotossintéticas) em plantas inoculadas com FMA quando sob condições de déficit hídrico, independentemente das condições de crescimento e estado nutricional das plantas (AUGÉ, 2001; RUIZ-LOZANO, 2003; SANCHEZ-BLANCO et al., 2004).

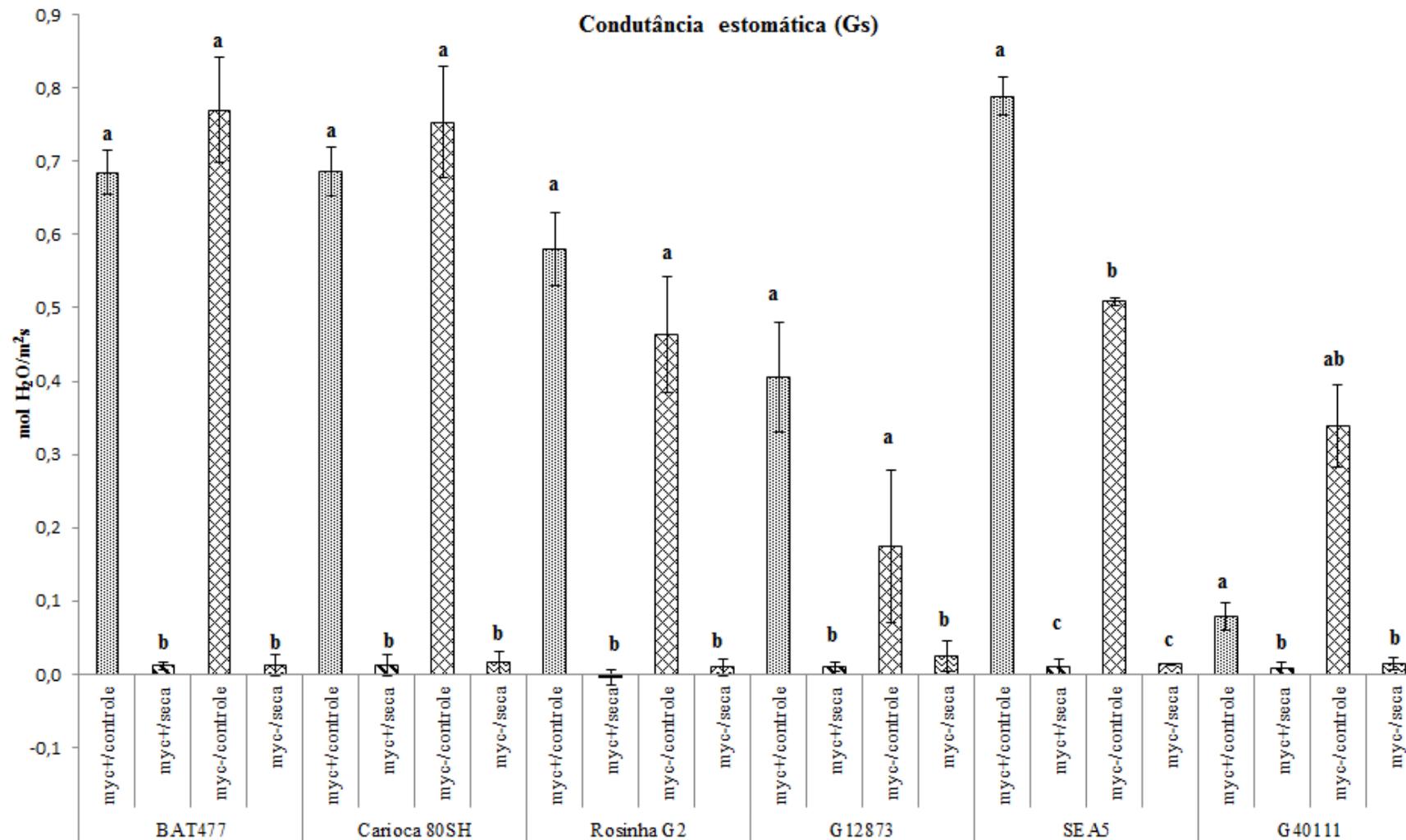
Em relação às taxas de assimilação fotossintética líquida (An), não foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos ( $p=0,0007$ ), sendo que as maiores diferenças foram somente identificadas entre os tratamentos ( $200 - p<0,0001$ ). De fato, Rosinha G2 foi o único genótipo a apresentar diferenças significativas entre os diferentes tratamentos após o teste de Tukey ( $p<0,05$ ) (Figura 3.7), sendo o tratamento controle inoculado com FMA (myc+/ctrl) apresentando maior An em relação ao controle não-inoculado (myc-/ctrl). Rosinha G2 foi o único genótipo a apresentar diferenças significativas entre os tratamentos inoculado e não-inoculado. Além disso, a micorrização não influenciou a eficiência fotossintética das plantas quando sob déficit hídrico. No geral, os valores médios de An foram iguais para todos os genótipos analisado, sendo a única exceção G40111. G 12873 sofreu forte aumento de An durante o tratamento inoculado controle irrigado, sendo que os valores médios da condição não-inoculado se aproximam daqueles dos tratamentos sob seca.

Os valores de  $F$  para as taxas médias de condutância estomática indicam uma significativa influência das diferenças genotípicas ( $23,29 - p<0,0001$ ) e entre os tratamentos ( $294,12 - p<0,0001$ ). BAT 477, IAC-Carioca 80SH e SEA-5 foram os genótipos que apresentaram os maiores valores de condutância estomática nos tratamentos controle irrigado, sendo que o teste de Tukey ( $p<0,05$ ) não apontam variações significativas para ambas as condições de déficit hídrico, myc+/strss e myc-/strss (Figura 3.8). SEA-5 e G40111 foram os únicos genótipos a exibirem diferenças significativas nos valores de condutância estomática comparando-se tratamentos inoculados e não-inoculados (Figura 3.8). SEA-5 apresentou maiores níveis de  $G_s$  em tratamento inoculado controle e G40111 no tratamento não-inoculado controle. A redução na condutância estomática em plantas sob déficit hídrico pode conduzir para um aumento no potencial hídrico da planta que dificultaria a captação de água do solo, dessa forma a manutenção de um  $G_s$  alto em plantas micorrizadas poderia ser uma importante estratégia auxiliar para a prevenção dos sintomas advindos da seca.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.7 – Taxa de assimilação fotossintética líquida ( $\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ ) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

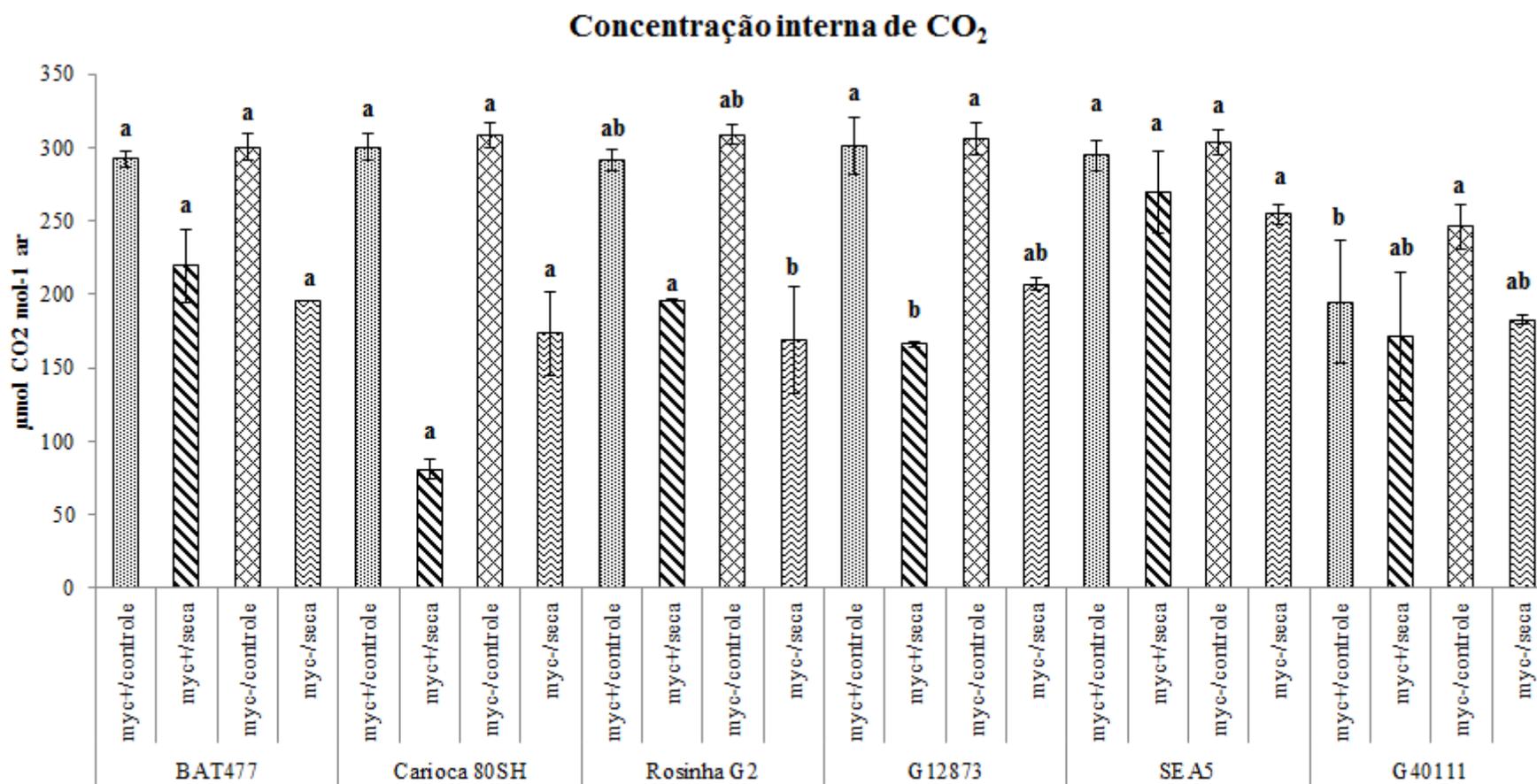
Figura 3.8 – Condutância estomática ( $\text{mol H}_2\text{O}/\text{m}^2\text{s}$ ) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

As baixas variações nas taxas de  $An$  e  $Gs$ , provavelmente derivadas da imposição do regime de déficit hídrico de forma lenta e gradual, refletem-se nos valores obtidos para a concentração interna de  $CO_2$  ( $Ci$ ) no tecido foliar, sendo que não foram encontradas variações significativas nos valores de  $F$  para os diferentes genótipos, somente uma pequena variação entre os diferentes tratamentos ( $5,45 - p=0,0002$ ). O teste de Tukey ( $p<0,05$ ) indicou que não houve nenhuma variação significativa nos valores médios de  $Ci$  coletados nos quatro tratamentos e referentes aos genótipos BAT 477, IAC-Carioca 80SH e SEA-5 (Figura 3.9). Rosinha G2 apresentou uma maior  $Ci$  durante a ocorrência de déficit hídrico em tratamento inoculado com FMA, sendo que esta razão foi inversa para o genótipo G 12873. Mais uma vez, o genótipo G40111 apresentou um efeito adverso da inoculação sobre o parâmetro avaliado, sendo que o tratamento  $myc+/ctrl$  demonstrou uma redução significativa de  $Ci$  em relação ao controle não-inoculado.

Foi detectada uma influência bastante significativa das diferenças genotípicas (valor médio de  $F = 14,6 - p<0,0001$ ) e dos tratamentos ( $347,8 - p<0,0001$ ) para as taxas de transpiração ( $E$ ) coletadas. Como a redução na transpiração também é um produto direto do fechamento estomatal durante o estresse, os resultados obtidos para a análise de Tukey ( $p<0,05$ ) para os valores médios de  $E$  são semelhantes aqueles obtidos para  $Gs$  (Figuras 5.8 e 5.10).

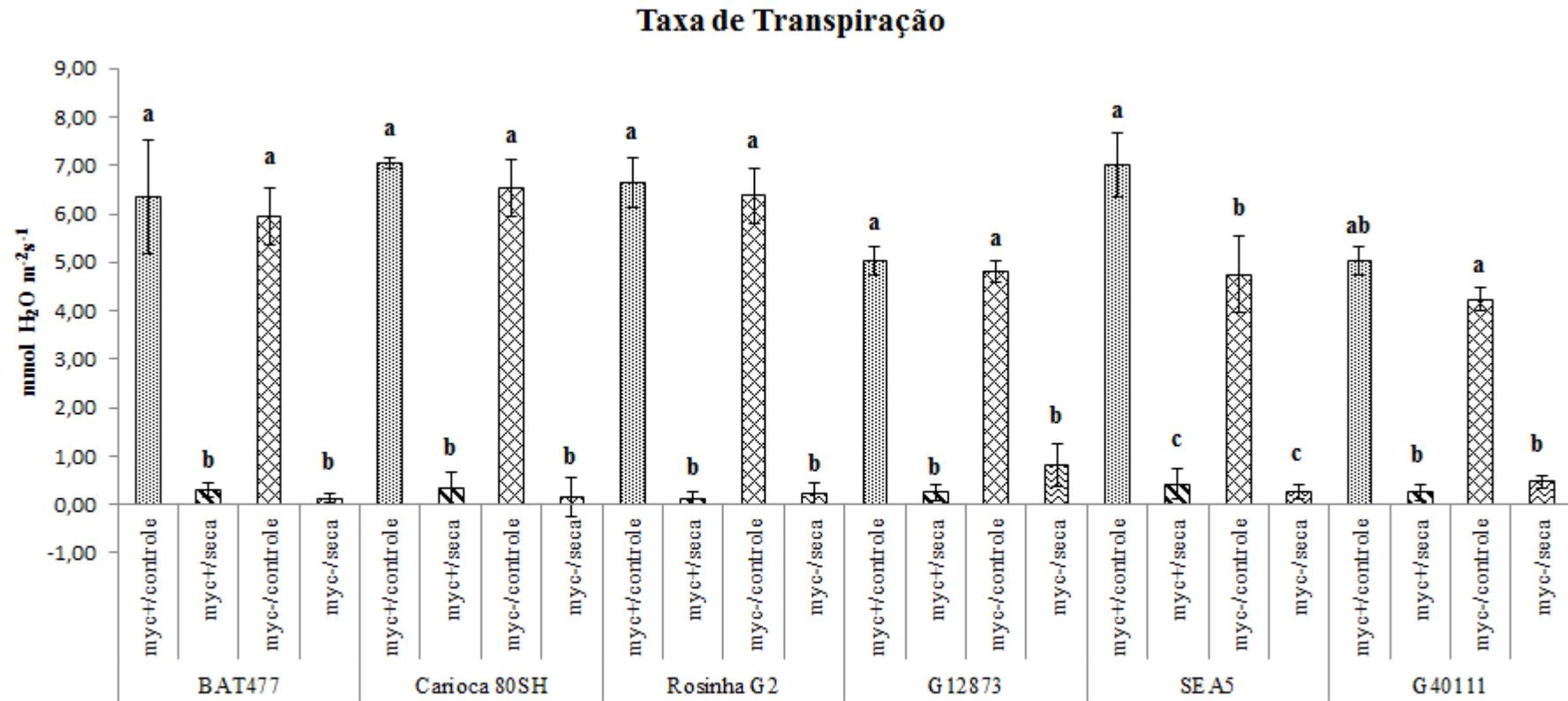
Para as taxas de assimilação fotossintética líquida ( $An$ ), condutância estomática ( $Gs$ ) e transpiração ( $E$ ), BAT 477 e SEA-5 apresentaram valores proximamente iguais e junto a IAC-Carioca 80SH demonstraram ser os genótipos mais eficientes para estas características. Entretanto, de todos os genótipos analisados, SEA-5 foi o único que se beneficiou da inoculação com FMA em todas os parâmetros analisados.

Os valores ideais de déficit de pressão de vapor na superfície foliar ( $v_{pdl}$ ) para o crescimento ótimo de plantas em casa de vegetação encontra-se entre 0.45 kPa a 1.5 kPa, sendo que alterações nesses valores acarretam numa maior necessidade de absorção de água através das raízes. Além de ser um interessante parâmetro que nos permitiu a validação dos ensaios de déficit hídrico, este parâmetro permitiu observar que o a baixa adequação do genótipo G40111 às nossas condições de experimentação visto que valores médios bastante altos de  $v_{pdl}$  para as condições controle, 2,27 kPa para  $Myc+$  e 2,41 kPa para  $Myc-$  sendo que estas diferenças foram bastante significativas pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ) (Figura 3.11).



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

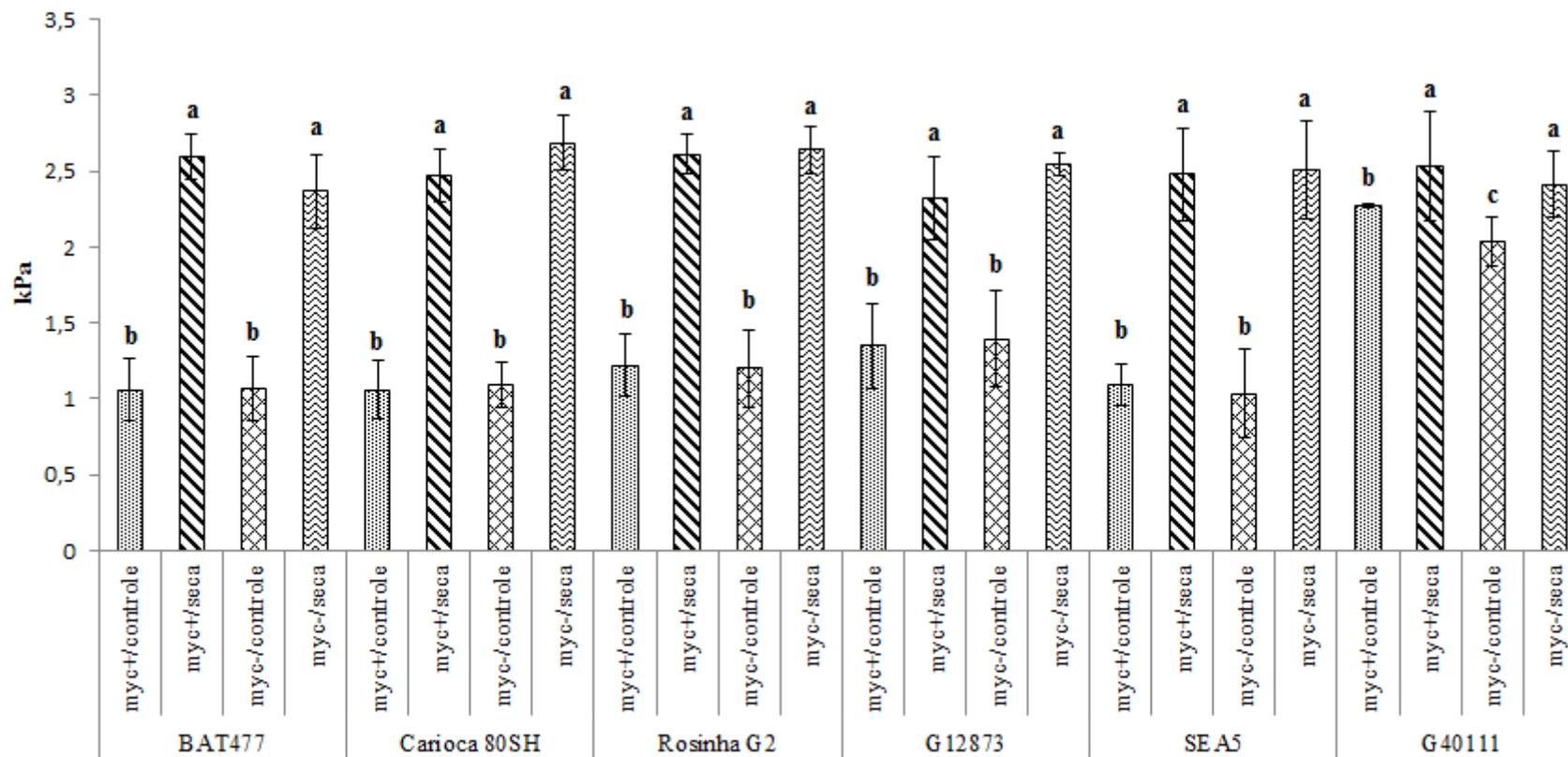
Figura 3.9 – Concentração interna CO<sub>2</sub> (µmol CO<sub>2</sub>/mol<sup>-1</sup> ar) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.10 – Taxa de transpiração (mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

### Déficit de pressão de vapor



\* Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Figura 3.11 – Déficit de pressão de vapor na superfície foliar (kPa) de folhas de plantas de feijoeiro sob colonização de FMA e imposição de um regime de déficit hídrico. Legenda: Myc+ - micorrizado; Myc- - Não-micorrizado.

### 3.3.5 Análise multivariada canônica

No geral, em quase todos os parâmetros analisados em nossas análises foi possível identificar uma forte influência dos tratamentos e genótipos sobre os resultados observados. Dessa forma, uma análise multivariada canônica foi realizada a fim de se discriminar os efeitos advindos de tratamentos e genótipos sobre os nossos resultados. A análise do gráfico na Figura 3.12 indica quatro tratamentos bastante definidos, sendo que os tratamentos sob inoculação com FMA são bastante distintos entre si e dos tratamentos não-inoculados.

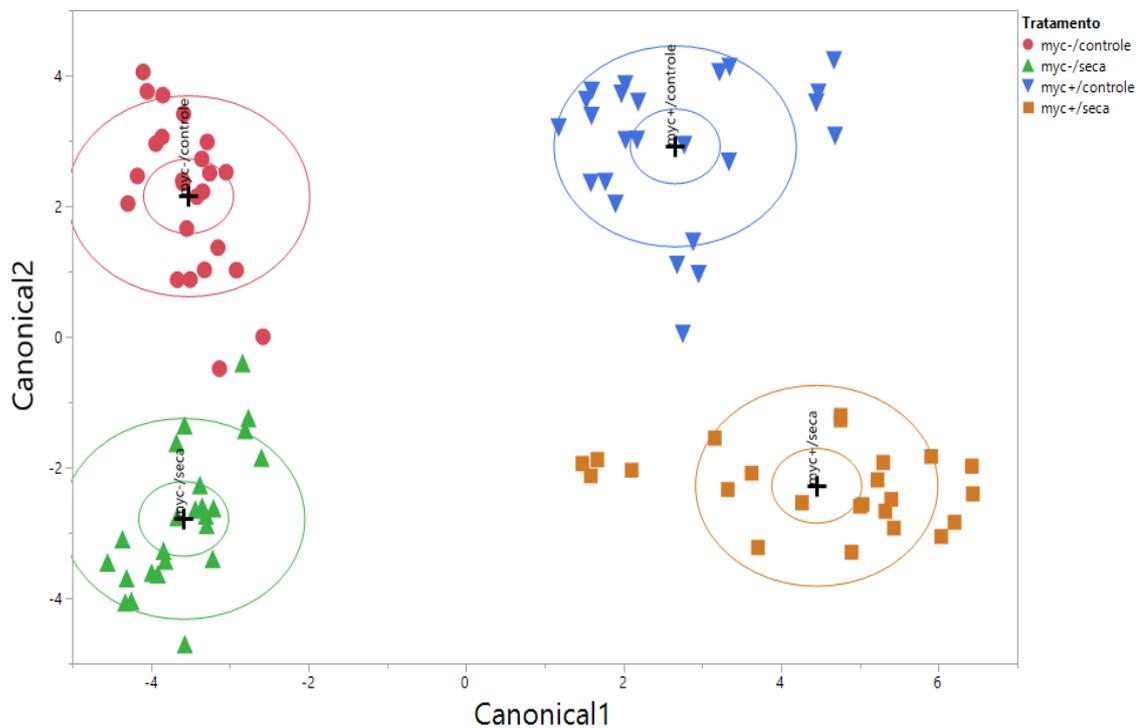


Figura 3.12 – Análise multivariada discriminante ou canônica contrastando os quatro tratamentos adotados em nossos ensaios: myc-/controle – plantas não-inoculadas por FMA irrigadas regularmente; myc-/seca – plantas não-inoculadas por FMA sob déficit hídrico; myc+/controle – plantas inoculadas por FMA irrigadas regularmente; myc+/seca – plantas inoculadas por FMA sob déficit hídrico.

Quanto aos genótipos utilizados, a linhagem selvagem G 12873 e o genótipo de outra espécie G40111, formaram agrupamentos mais isolados e de fato, foram os que apresentaram resultados mais discrepantes em nossas análises (Figura 3.13). Tal resultado era esperado visto que G40111 pertence a espécie *P. acutifolius* e G 12873 tem tamanho e hábitos de crescimento bastante distintos. Interessante notar que os demais genótipos tenham obtidos resultados tão semelhantes visto que possuem histórico de melhoramento genético e níveis de tolerância a déficit hídrico tão distintos.

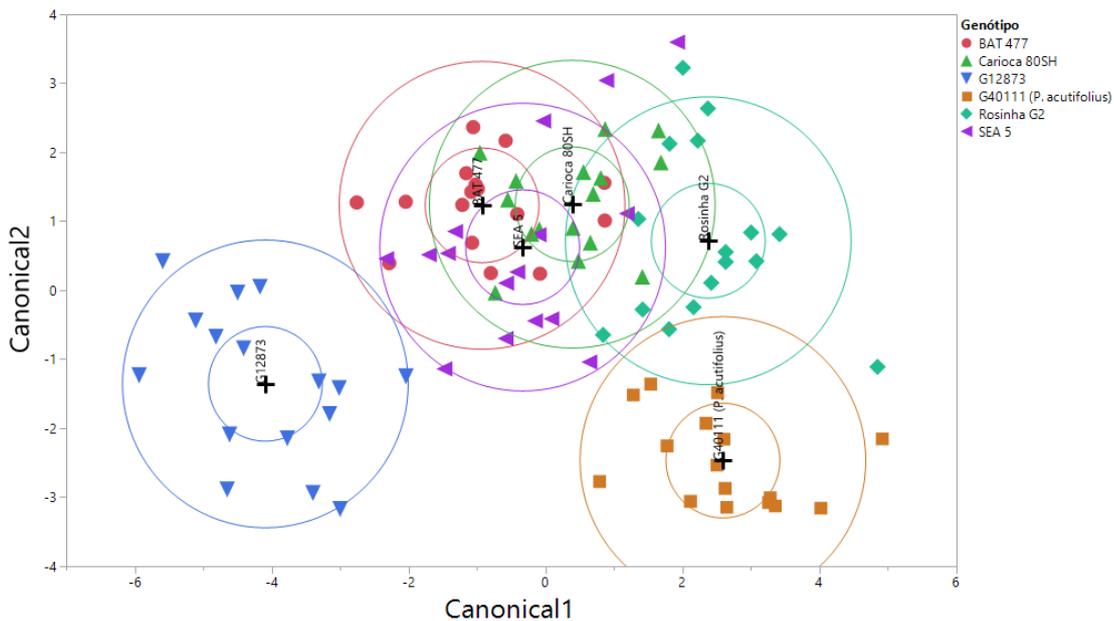


Figura 3.13 - Análise multivariada discriminante ou canônica contrastando os seis genótipos adotados em nossos ensaios.

### 3.4 Conclusões

Embora o emprego da associação com FMA em plantas no sentido de atenuar os efeitos negativos advindos do déficit hídrico seja um campo de pesquisa em ascensão, estudos complementares devem ser conduzidos no intuito de elucidar os processos biológicos pelos quais tal associação benéfica acontece. Neste estudo, foi possível indicar que para a o modelo de interação feijoeiro-FMA genótipos com distintos históricos de melhoramento genético podem se beneficiar de maneira diferente dessa associação sob condições de déficit hídrico. Com exceção do genótipo G 12873, todos os demais apresentaram um aumento nas taxas de colonização por FMA sob indução de déficit hídrico. Parâmetros relacionados a acúmulo de massa seca foliar e radicular foram os mais eficientes para contrastar os diferentes genótipos. A inoculação com FMA demonstrou ter efeito positivo sobre o crescimento radicular em ambas condições (tratado e controle) somente para BAT 477 e IAC-Carioca 80SH. Rosinha G2 e G12873 foram os únicos genótipos a demonstrarem um aumento na taxa de assimilação fotossintética em plantas inoculadas. A inoculação produziu aumentos significativos na taxa de condutância estomática e transpiração no genótipo SEA-5, e redução em G40111. Rosinha G2 apresentou um maior acúmulo de CO<sub>2</sub> em plantas inoculadas, sendo este fator inverso em G12873 e G40111. SEA-5 foi o único que se beneficiou da inoculação com FMA em todas os parâmetros fisiológicos analisados.

## Referências

- ABDELMONEIM, T. S.; MOUSSA, T. A. A.; ALMAGHRABI, O. A.; ALZHRANI, H. S.; ABDELBAĞI, I. Increasing plant tolerance to drought stress by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. **Life Science Journal**, Zhengzhou City, v. 11, n. 1, p. 10–17, 2014.
- ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; ADAMS, M. W. Plant traits and yield stability of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars under drought stress. **The Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 213-219. 1991.
- AUGÉ, R. M. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 11, n. 1, p. 3–42, 2001.
- BÁRZANA, G.; AROCA, R.; PAZ, J. A.; CHAUMONT, F.; MARTINEZ-BALLESTA, M. C.; CARVAJAL, M.; RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. **Annals of Botany**, Oxford, v. 109, n. 5, p. 1009–1017, 2012.
- BEEBE, S. E.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; ACOSTA-GALLEGOS, J. A. Phenotyping common beans for adaptation to drought. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 4, n. 35, p. 1–20, 2013.
- BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A.; SCANNERINI, S. Morphogenetic Modifications Induced by the Mycorrhizal Fungus *Glomus* Strain E 3 in the Root System of *Allium porrum* L. **New Phytologist**, Oxford, v. 114, n. 2, p. 207–215, 1990.
- BERTA, G.; TROTTA, A.; FUSCONI, A. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 281–293, 1995.
- BLUM, A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential - Are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? **Australian Journal of Agricultural Research**, Clayton, v. 56, n. 11, p. 1159–1168, 2005.
- BOTA, J.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, Oxford, v. 162, n. 3, p. 671–681, 2004.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Phenotyping common beans for adaptation to drought**: Protocol for Greenhouse Evaluation. Cali: CIAT, 2012. 11 p.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.
- CLEMENTS, J.; ATKINS, C. Characterization of a non-abscission mutant in *Lupinus angustifolius*. I. Genetic and structural aspects. **American Journal of Botany**, New York, v. 88, n. 1, p. 31–42, 2001.

DOUBKOVÁ, P.; VLASÁKOVÁ, E.; SUDOVÁ, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alleviates drought stress imposed on *Knautia arvensis* plants in serpentine soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 370, n. 1-2, p. 149–161, 2013.

GIANINAZZI, S. Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, n. 12, p. 1947–1955, 1996.

GUTJAHR, C.; CASIERI, L.; PASZKOWSKI, U. *Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. **New Phytologist**, Oxford, v. 182, n. 4, p. 829–837, 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HOOKER, J. E.; MUNRO, M.; ATKINSON, D. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi induced alteration in poplar root system morphology. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, n. 2, p. 207–214, 1992.

IBIJIJEN, J.; URQUIAGA, S.; ISMAIL, P.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*). **New Phytologist**, Oxford, v. 134, n. 2, p. 353–360, 1996.

JEBARA, M.; AOUANI, M. E.; PAYRE, H.; DREVON, J. J. Nodule conductance varied among common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes under phosphorus deficiency. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 3, p. 309–315, 2005.

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

LAWLOR, D. W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: A critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 561–579, 2009.

LEE, B. R.; MUNEER, S.; AVICE, J. C.; JUNG, W. J.; KIM, T. H. Mycorrhizal colonisation and P-supplement effects on N uptake and N assimilation in perennial ryegrass under well-watered and drought-stressed conditions. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 22, n. 7, p. 525–534, 2012.

LI, T.; LIN, G.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; ZHANG, S.; CHEN, B. Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 24, p. 595–602, 2014.

- LIZANA, C.; WENTWORTH, M.; MARTINEZ, J. P.; VILLEGAS, D.; MENESES, R.; MURCHIE, E. H.; PASTENES, C.; LERCARI, B.; VERNIERI, P.; HORTON, P.; PINTO, M. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 685–697, 2006.
- LYNCH, J.; WHITE, J. W. Shoot nitrogen dynamics in tropical common bean. **Crop Science**. Madison, v. 32, n. 2, p. 392-397, 1992.
- NEUMANN, P. M. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, n. 7, p. 901–907, 2008.
- ORFANOUDAKIS, M.; WHEELER, C. T.; HOOKER, J. E. Both the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* and Frankia increase root system branching and reduce root hair frequency in *Alnus glutinosa*. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 20, n. 2, p. 117–126, 2010.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 869–882, 2011.
- PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 403, p. 1743–1750, 2004.
- RAPPARINI, F.; PEÑUELAS, J. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In: MIRANSARI, M. (Ed.). **Use of microbes for the alleviation of soil stresses**. 1. ed. New York: Springer, 2014. p. 21-42.
- RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. D. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 127–136, 1998.
- RAVEN, P. H.; REVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Energetics: The flow of energy; respiration; photosynthesis, light, and life. In: \_\_\_\_\_. **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Section 2.
- RAUF, S.; SADAQAT, H. A. Effects of varied water regimes on root length, dry matter partitioning and endogenous plant growth regulators in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Plant Interactions**, London, v. 2, n. 1, p. 41-51, 2007.
- ROSALES, M. A.; OCAMPO, E.; RODRÍGUEZ-VALENTÍN, R.; OLVERA-CARRILLO, Y.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A. A. Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 56, p. 24–34, 2012.
- RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 13, n. 6, p. 309–17, 2003.

RUIZ-SÁNCHEZ, M.; ARMADA, E.; MUÑOZ, Y.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M.; AZCÓN, R. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 10, p. 1031–1037, 2011.

SÁNCHEZ-BLANCO, M. J.; FERRÁNDEZ, T.; MORALES, M. A.; MORTE, A.; ALARCÓN, J. J. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. **Journal of plant physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 6, p. 675–682, 2004.

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell & Environment**, Chichester, v. 25, n. 2, p. 211–222, 2002.

TAJINI, F.; SURIYAKUP, P.; VAILHE, H.; JANSA, J.; DREVON, J.-J. Assess suitability of hydroaerobic culture to establish tripartite symbiosis between different AMF species, beans, and rhizobia. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 73, 2009.

TANG, C.; DREVON, J. J.; JAILLARD, B.; SOUCHE, G.; HINSINGER, P. Proton release of two genotypes of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by N nutrition and P deficiency. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 260, n. 1-2, p. 59–68, 2004.

WHITE, R. G.; KIRKEGAARD, J. A. The distribution and abundance of wheat roots in a dense, structured subsoil - Implications for water uptake. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 33, n. 2, p. 133–148, 2010.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 33, n. 4, p. 510–525, 2010.

YANO, K.; YAMAUCHI, A.; KONO, Y. Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 6, n. 5, p. 409–415, 1996.

#### 4 ANÁLISE TEMPORAL DE GENES RESPONSIVOS AO DÉFICIT HÍDRICO EM GENÓTIPO TOLERANTE (BAT477) INOCULADO COM FMA

##### Resumo

Acredita-se que o fator determinante que condiciona para a elevada performance apresentada por plantas colonizadas por FMA frente a estresses bióticos e abióticos seja a alteração provocada nos perfis de expressão gênica locais e globais da planta durante a interação simbiótica. A busca por genes candidatos que validem tal hipótese tem crescido nos últimos anos e os fatores de transcrição pertencentes à família NAC (NAM, ATAF, CUC) podem se mostrar apropriados para esse propósito. A família de genes NAC correspondem a uma das famílias gênicas mais abundantes e amplamente distribuídas nos genomas de plantas, além de serem extremamente diversas estando envolvidas numa ampla gama de processos que incluem desde a regulação do desenvolvimento até a resposta a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, poucos estudos se dedicaram a caracterização dessa família de genes em plantas, e dado sua alta diversidade de funções, ela se mostrou bastante promissora para a caracterização do perfil de expressão gênica envolvido na resposta de nosso modelo de interação feijoeiro-FMA ao déficit hídrico. A busca *in silico* por sequências de genes NAC em feijoeiro resultaram num total de 96 transcritos que foram agrupados filogeneticamente e caracterizados. Perfis de expressão gênica de dez destes transcritos foram obtidos por meio de RT-qPCR contrastando plantas de feijoeiro (BAT 477) inoculadas com mistura de FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata* e *G. rosea*), e não-inoculadas, submetidas a um período de déficit hídrico de 48, 72 e 96 horas. Plantas colonizadas por FMA evidenciaram um mecanismo mais tardio, e ao mesmo tempo mais intenso, de regulação de expressão gênica. *PvNAM4* e *PvNAC4* foram induzidos após 72 horas de déficit hídrico somente em plantas micorrizadas, demonstrando mecanismos exclusivos de resposta. Análises de RNASeq validam estes resultados e adicionam mais oito genes, entre induzidos e reprimidos, a esta lista.

Palavras-chave: NAC. NAM. Fatores de transcrição. Análise *in silico*.

**Abstract**

It is believed that the preponderant factor that determines the high performance expressed by AM-plants during biotic and abiotic stresses are related to shifts on both local and global gene expression profiles during the symbiotic interaction. The search for candidate genes that corroborate this hypothesis have grown in the last years and transcription factors related to NAC family (NAM, ATAF, CUC) may be fitted for this purpose. NAC is one of the most abundant and amply distributed gene families in plant genomes. Besides, they are extremely diverse and involved in a large range of processes that includes from development regulation to responses to biotic and abiotic stresses. However, just a few studies have focused on this gene family characterization in plants, and given its high diversity of functions, it has proved to be a great promising candidate for studies of gene expression regulation during the interaction between plants and AMF under water deficit. An *in silico* search for NAC genes in common bean returned a set of 96 transcripts which were grouped phylogenetically and categorized. Gene expression profiles from 10 of these transcripts were obtained through RT-qPCR contrasting AM and non-AM plants of common bean (BAT 477) inoculated with a mixture of AMF (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*), submitted to a water deficit regime of 48, 72 and 96 h. AM plants showed a delayed mechanism, and at the same time more intense, of regulation of gene expression. *PvNAM4* and *PvNAC4* were upregulated after 72 h of water deficit only on AM plants, demonstrating a possible exclusive mechanism of response. RNA-Seq analysis validate these results and add eight genes, between up- and downregulated, to this list.

Keywords: NAM. NAC. Transcription factors. *in silico* analysis.

#### 4.1 Introdução

Fatores de transcrição (FTs) são proteínas que se ligam ao DNA e interagem com outros reguladores de transcrição, incluindo proteínas remodeladoras/modificadoras de cromatina, a fim de recrutar/bloquear o acesso de RNA-polimerases à fita molde de DNA. O genoma das plantas é constituído de aproximadamente 7% por FTs, sendo que estudos revelam que leguminosas codificam em média cerca de 2000 FTs por genoma (UDVARDI et al., 2007).

Acredita-se que a interação com FMA ocasione nas plantas mudanças locais e globais nos perfis de expressão de genes cujos produtos são críticos durante a resposta metabólica da planta a estresses bióticos e abióticos (PORCEL; AROCA; RUIZ-LOZANO, 2012). Estudos moleculares têm sido empregados para se identificar diversos processos que envolvem FMA, e tem permitido a identificação de uma série de genes importantes para a interação. Indícios apontam para o fato de que FMA possam influenciar os padrões de respostas das plantas a estresses através da regulação fina da expressão de FTs (MANTHEY et al., 2004; HOGEKAMP; KÜSTER, 2013; RUZICKA et al., 2013; WIPF et al., 2014; CERVANTES-GÁMEZ et al., 2015).

Em plantas, os fatores NAC pertencem a uma superfamília de genes que compreende os fatores NAM (*No-Apical Meristem*), ATAF (*Arabidopsis transcription activation factor*) e CUC (*Cup-shaped cotyledon*) (PURANIK et al., 2012). Diversos membros dessa família vêm sendo identificados e caracterizados em espécies modelos tais como *Arabidopsis* (TRAN et al., 2010; FUJITA et al., 2004) e arroz (*Oriza sativa*) (HU et al., 2006; HU et al., 2008). Os FTs NACs estão associados a uma série de processos que envolvem regulação do desenvolvimento (OLSEN et al., 2005), senescência (KJAERGAARD et al., 2011; YANG et al., 2011), formação de parede secundária (ZHONG; LEE; YE, 2010), e resposta a estresses de origem biótica (OLSEN et al., 2005; CHRISTIANSON et al., 2010) e abiótica (NAKASHIMA et al., 2012; RECCHIA et al., 2013).

Proteínas NAC compartilham um domínio N-terminal bastante conservado (~150 aa) que é subdividido em cinco subdomínios conservados (A-E) (PURANIK et al., 2012). As porções C e D são altamente conservadas, sendo responsáveis pela ligação ao DNA, sendo que D pode também conter um domínio NARD altamente hidrofóbico que se liga ao DNA para suprimir transcrição (HAO et al., 2010); a porção A é responsável pela formação de dímeros; as porções B e E são mais variáveis e estão relacionadas à diversificação de funções (OOKA et al., 2003; ERNST et al., 2004; JENSEN et al., 2010; CHEN et al., 2009). A porção C-terminal é mais variável e é a responsável pela regulação da transcrição

(porção TRR – *transcription regulatory*) (OLSEN et al., 2005), que possui tanto função ativadora quanto repressora e pode também possuir habilidade de ligação a proteína (PURANIK et al., 2012). Será esta região que concederá variações para funções individuais de cada proteína NAC (JENSEN et al., 2010; KJAERGAARD et al., 2011).

As regiões promotoras reguladoras da expressão de genes NAC possuem motivos de reconhecimento para uma série de FTs (NAKASHIMA et al., 2012). A expressão de genes NAC responsivos ao estresse podem ser reguladas por uma série de elementos-*cis* contidos em suas regiões promotoras tais como: ABREs (*ABA-responsive elements*) da via do ABA; DREs (*Dehydration responsive elements*) tais como os da via ABA-independente; LTREs (*low-temperature responsive elements*); MYB (*Myeloblastosis*) e MYC (*Myelocytomatosis*); W-Box, das vias dos elementos responsivos ao ácido jasmônico e ácido salicílico (NAKASHIMA et al., 2012).

Um fator NAM, classificado inicialmente como *NAC protein* (Phvul005G136400), foi selecionada a partir de uma biblioteca subtrativa por supressão de hibridização de cDNA como sendo altamente responsivo ao déficit hídrico em feijoeiro (BAT 477) quando comparado ao genótipo suscetível IAC-Carioca 80SH. Além disso, por estar envolvido em uma ampla gama de processos biológicos que envolvem respostas a estresses de origem bióticos e abióticos, os fatores NAC são candidatos perfeitos para estudos de expressão gênica com variação temporal envolvendo a colonização por FMA e déficit hídrico. Dessa forma, o banco de dados do genoma de referência do feijoeiro (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) foi utilizado para a prospecção de sequências de genes NAC, que foram enriquecidas com sequências já descritas para outras espécies de plantas. Análises filogenéticas, caracterização dos domínios conservados e mapeamento foram realizados *in silico*. Com base nos diferentes grupos obtidos, transcritos foram selecionados e tiveram seu perfil de expressão gênica analisados em amostras de RNA total de raízes de BAT 477 colonizadas por FMA e submetidas a um período total de 96 horas de déficit hídrico. Estas análises permitiram a identificação e caracterização da família de genes NAC em feijoeiro, bem como identificar o período em que as plantas se mostravam mais responsivas à seca sob inoculação com FMA.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Desenho experimental e ensaio de déficit hídrico

O experimento foi instalado em Casa de Vegetação (Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP, Piracicaba, SP – Brasil). Para os ensaios de déficit hídrico e inoculação com FMA foram adotados dez replicadas biológicas com distribuição inteiramente casualizadas. Quatro tratamentos foram considerados: (i) plantas de BAT 477 inoculadas sob déficit hídrico (myc+/seca); (ii) plantas de BAT 477 inoculadas controle irrigado (myc+/controle); (iii) plantas de BAT 477 não-inoculadas sob déficit hídrico (myc-/seca); (iv) plantas de BAT 477 não-inoculadas controle irrigado (myc-/controle).

O plantio das sementes foi realizado em vasos contendo mistura de areia e vermiculita 2:1, lavada e esterelizada em auto-clave por 30 min a 120 atm. A inoculação com FMA (mistura contendo esporos e partes de hifas de *G. clarum*, *A. scrobiculata* e *G. rosea*) foi conduzida no momento do plantio da semente, consistindo de 50 ml do substrato obtido das culturas armadilhas (2:1 areia e vermiculita) que foram depositados no centro de cada vaso para os tratamentos inoculados. Os tratamentos não-inoculados receberam 50 ml do mesmo substrato, porém previamente esterilizado. O modelo de cultivo armadilha dos inóculos de FMA adotado em nossos experimentos encontra-se descrito no Anexo A – Figura Suplementar A.1).

O corte na irrigação foi efetuado após 50% das plantas atingirem o estado fenológico de pré-floração (R5) (CIAT, 1983). Foram realizadas três aplicações com solução nutritiva de Hoagland (Anexo A – Tabela Suplementar A.1) (HOAGLAND; ARNON, 1950). A primeira rega foi feita após dez dias com solução completa para todos os vasos, seguida por outra rega com solução completa após sete dias. A terceira rega foi efetuada sete dias após a segunda, desta vez com solução de Hoagland com deficiência de fósforo para os tratamentos inoculados. Água deionizada foi utilizada para a manutenção das culturas durante todo o experimento.

No total, três coletas (de folhas e raízes) foram realizadas: decorridos 48, 72 e 96 horas de imposição de déficit hídrico. Amostras foram maceradas com uso de nitrogênio líquido e armazenadas em *ultrafreezer* a -80°C. O monitoramento do grau de umidade dos vasos foi determinado através do uso de termo-higrômetro digital.

### 4.2.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento e estado fisiológico das plantas

Para o cálculo do comprimento radicular, uma placa quadriculada com 1 cm de lado foi utilizada para fotografar raízes recém coletadas. ImageJ 1.46r ([HTTP://imagej.nih.gov/ij](http://imagej.nih.gov/ij)) foi

usado para determinar o comprimento de cada raiz. Quinze medidas foram tomadas para cada raiz.

O conteúdo relativo de água (RWC) foi estimado da seguinte forma: Das 08:00 h às 10:00 h da manhã foi feita a coleta de um folíolo completamente e recém expandido de cada planta e pesados para a obtenção do peso fresco (Pf) – inicialmente foram coletadas todas as plantas do tratamento controle e posteriormente todas as plantas do tratamento de seca. As folhas foram imersas totalmente em água deionizada por 5 horas e pesadas seguindo a exata ordem de coleta para a obtenção do Peso túrgido (Pt). Todas as amostras foram mantidas em estufa ventilada a 65°C por 48 h e pesadas para a coleta do peso seco (Ps). RWC foi calculado seguindo a equação:  $RWC(\%) = [(Pf-Ps)] / [(Pt-Ps)] * 100$ .

#### 4.2.3 Taxa de colonização das plantas por FMA

Para detalhes acerca do procedimento da contagem dos pontos de colonização e estimativas das taxas de colonização de raízes ver Anexo A – Figura Suplementar A.1, A.2 e A.3.

#### 4.2.4 Identificação e caracterização genômica da família de genes NAC (NAM/ATAF1/CUC) em feijoeiro

Todas as informações relacionadas às sequências (genes, genoma de referência, sequências de aminoácidos e anotações funcionais) foram obtidas junto ao banco de dados de feijoeiro (*P. vulgaris* L.) disponíveis no Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (SCHMUTZ et al., 2014). Resumidamente, uma busca pelos termos de anotação NAC, NAM e CUC resultaram em 90 sequências NAM e seis sequências NAC. Análises filogenéticas e de alinhamentos múltiplos das sequências de aminoácidos foi efetuada a partir do pacote de programas MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). O alinhamento foi feito a partir do algoritmo CLUSTAL W, usando uma matrix de BLOSUM (parâmetros padrões). O método de *Neighbor-joining* foi utilizado para a construção das árvores filogenéticas (NEI, 1987).

Duas estratégias complementares foram empregadas para a classificação das sequências em sub-grupos funcionais. Inicialmente, o banco de dados de sequências NAM e NAC de feijoeiro foi enriquecido com sequências de *O. sativa*, *G. max*, *Arabidopsis thaliana* obtidas a partir de bancos de dados públicos: TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>); NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>); OsGDB (<http://www.plantgdb.org/OsGDB/>) (OOKA et al., 2003; FANG et al., 2008; TIEN et

al., 2011; PURANIK et al., 2012). Posteriormente, as ferramentas MUST e MEME do pacote MEME 4.10.1 (*Multiple Em for Motif Elicitation* - <http://meme-suite.org/tools/meme>) foram utilizadas para a identificação de motivos conservados e caracterização dos subgrupos de acordo com a distribuição destes motivos nas sequências (BAILEY; GRIBSKOV, 1998; BAILEY et al., 2009).

A ferramenta Jbrowse (disponível em Phytozome: <http://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/index.html>) foi utilizada, com base nas sequências de nucleotídeos, para a identificação da posição dos genes nos 11 cromossomos de feijoeiro tomando como base o banco de dados do genoma de referência (SCHMUTZ et al., 2014). O mapa da localização dos genes nos cromossomos foi obtido utilizando a macro MapDraw v2.1 (LIU; MENG, 2003).

A identificação dos domínios funcionais das sequências foi feita com base em modelo proposto por Ooka et al. (2003). O alinhamento das sequências pelos domínios funcionais foi feito utilizando a ferramenta COBALT do NCBI ([http://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re\\_cobalt.cgi?](http://www.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi?)).

#### **4.2.5 Desenho de primers para a análise de RT-qPCR**

Todas as sequências selecionadas foram submetidas à ferramenta ORFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para a exclusão de domínios conservados e submetidas à ferramenta Primer 3 input (version 0.4.0, [www.frodo.wi.mit.edu/](http://www.frodo.wi.mit.edu/)) para o desenho dos primers seguindo os seguintes critérios: 1) *Product size range*: 150-200 bp; *Primer Size*: mínimo 18, ótimo 20, máximo 22; *Primer Tm*: min 57, opt 60, max 63; %GC: 40-60%. Todos os primers foram testados por qualidade usando a ferramenta NetPrimer ([www.premierbiosoft.com/netprimer](http://www.premierbiosoft.com/netprimer)). A Tabela 4.1 contém todos os primers utilizados para as análises de RT-qPCR.

Tabela 4.1- Primers desenhados para RT-qPCR. Nome do primer, anotação gênica para o amplicon selecionado de acordo com bancos de dados de *P. vulgaris*, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento (°C), conteúdo de GC (%) e tamanho do amplicon (bp).

<i>Primer</i>	<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	<i>GC%</i>	<i>pb</i>
NAM32	<i>Phvul.005G136400</i>	F: TGAAACCCCTGCGTAAAATC R: TTCGGGGAATAATCAAGTGG	59,94 59,76	45 45	201
DREB1a	<i>Phvul.0091025959</i>	F: TCGTTCGAGCAATTAGAGAA R: TCCTGATGCGTCTGGTATTG	60,24 59,99	50 50	153
PvNAC3	<i>Phvul.005G031400</i>	F: GGCCAGACAACCTGGAAAAC R: GCAACTGCCTCAAAGGTCTC	59,57 60	50 55	142
PvNAC4	<i>Phvul.009G038400</i>	F: AGCAGTTCAGGATGCCAGAT R: TGTCTCCGTCGTGAGTCTTG	59,83 60,02	50 55	198
PvNAC5	<i>Phvul.009G044200</i>	F: CTTCCCCTGAGGTTCAAACA R: CGTCATCGTCGTCTTCTTCA	60,08 59,98	50 50	147
PvNAC6	<i>Phvul.011G041900</i>	F: GAAGACGTGAAGGACGAAGC R: CCCTACTAACGCCCGTAACA	60 60	55 55	178
PvNAM60	<i>Phvul.002g171600</i>	F: CTCGGAGGGTTCCAAGTGTA R: GGGGATGAGGATGGGTTAGT	60,1 60,01	55 55	135
PvNAM45	<i>Phvul.008g001000</i>	F: GGTCTTCTCCTTCCCTTTGC R: GTGGCCTTCCAATAACCTGA	60,16 59,93	55 50	180
PvNAM4	<i>Phvul.010g118700</i>	F: AATGAAGGGTCATTCGCAAC R: GAGCTGAGAGGCAACCAAAC	59,94 60	45 55	132
PvNAM28	<i>Phvul.005g047300</i>	F: GGTTTAGGTTCCACCCACT R: CCAAGGTTTCGCACTTGTAT	60,09 59,99	55 50	123
PvNAM41	<i>Phvul.008g159200</i>	F: ATCAAGGATTGTGGGGCATA R: TCCAACACCACATTTTCCAG	60,16 59,39	45 45	159
DREB1c	<i>Phvul.007G066500</i>	F: GAGCCCAACAAGAAGACCAG R: AGTCGCGCAAATTGAGACAG	59,84 60,04	55 50	124
ABF2	<i>Phvul.009G065500</i>	F: TTGCTACTGGGTCTCCTGCT R: CACAGCTCCTCCACTCTTCC	60,01 59,99	55 60	137
CBF4	<i>Phvul.007G066500</i>	F: GAGCCCAACAAGAAGACCAG R: AGTCGCGCAAATTGAGACAG	59,84 60,4	55 50	124

Para a validação dos primers e otimização das condições de amplificação foi conduzida uma reação de PCR seguindo as seguintes especificações: 2,5 µl de PCR Buffer (10X); 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl de dNTP's (2,5 mM); 1 µl de Primer Forward (2,5 mM); 1 µl de Primer Reverse (2,5 mM), 1 µl de DNA (20ng/µl); 0,2 µl Taq Polymerase (50U/1 µl) e 15,3 µl de água DEPC 0,1%. As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de: 30 seg de desnaturação a 94°C, 30 s de anelamento a 59°C, 15 s de extensão a 72°C; 7 min de extensão final a 72°C. Após a reação a qualidade dos produtos de amplificação foi verificada em gel de agarose 1,2% em 1X TSB buffer, junto com padrão de 100 pb de DNA. Pares de primers que apresentaram amplificação inespecífica de amplicons passaram por uma segunda etapa de testes seguindo as mesmas condições de PCR, porém 1 µl de cDNA (100ng/µl).

#### 4.2.6 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A extração de RNA total das amostras foi realizada utilizando o kit TRIzol® Reagent (Invitrogen). Em tubos contendo cerca de 50 mg de amostras de raiz macerada, foi adicionado 1 ml de TRIzol®, agitados vigorosamente (1 min) e mantidos à temperatura ambiente (5 min). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas à 4°C, (10 min) a 12.000 G. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 200 µL de clorofórmio, agitados e deixados em gelo (3 min), sendo em seguida centrifugados (15 min) a 12.000 G. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 500 µL de isopropanol, agitados suavemente e armazenadas em gelo (10 min), sendo mais uma vez centrifugadas (10 min) a 12.000 G. O sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado com etanol 75% (diluído com água DEPC 0,1%) e centrifugado (5 min), a 7600 G. As amostras foram deixadas para secar à temperatura ambiente por 20 min e em seguida foram ressuspensas em 20 µL de água DEPC 0,1%. As amostras foram mantidas por 10 min em banho-maria a 60°C, para dissolução da amostra de RNA. A concentração e a qualidade das amostras foram estimadas nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, em Nanodrop 2000®, e sua integridade foi confirmada em gel de agarose 1,5% em tampão TAE.

Exatos 1 µg de cada amostra de RNA foram tratados com 1 unidade de DNase na presença de tampão da enzima. As amostras foram diluídas a 100 ng/µL. Para preparar a reação de RT-qPCR, 100 ng de cada amostra de RNA tratadas com DNase foram utilizados para sintetizar a primeira fita de cDNA (sscDNA). A síntese foi realizada utilizando o kit *Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for two step RT-qPCR* (Fermentas™) seguindo as instruções da fabricante.

As reações de RT-qPCR foram preparadas utilizando o kit *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fementas™), seguindo instruções do fabricante. As reações foram preparadas em volume final de 10 µL, contendo 0,25 µM de cada primer, 1 µL de cDNA e 5 µL de SYBR Green mix. A amplificação e leitura das amostras foi realizada no equipamento *StepOnePlus™ RealTime PCR Systems* (Applied Biosystems). Para cada amostra foram obtidas as curvas de amplificação e dissociação, para posterior análise. Cada amostra foi analisada em triplicata técnica. A amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s para desnaturação, 59°C por 20 s para anelamento dos primers e 72°C por 20 s para extensão dos fragmentos. Posteriormente foi realizada a construção da curva de *melting*: 95°C por 15 s, 60°C por 1 min com coleta de dados de fluorescência a cada 0,7° de variação (60°C a 95°C). Para cada placa de RT-qPCR analisada, foram incluídos dois genes de referência (IDE e skip16) como controle interno (BORGES; TSAI; CALDAS, 2012).

Os valores de eficiência (E) e de Ct (*cycle threshold*) foram obtidos com o uso de do programa LinRegPCR (12.x) (RUIJTER et al., 2009). O programa REST®2009 (QUIAGEN®) foi utilizado para obter os valores médios de  $N_0$  para cada uma das triplicatas e assim normalizar os resultados com base no valor de  $N_0$  dos genes de referência. Desta forma, foi possível gerar os valores de expressão gênica relativa para cada um dos transcritos analisados. Heatmaps foram construídos com base nos valores de expressão gênica relativa utilizando a função Heatmap.2 do pacote gplots (versão 2.12.1) do R (x64 3.2.0) e editadas com o auxílio do programa MapMan 3.5.1R2 (USADEL et al., 2009).

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Identificação de genes NAC em feijoeiro

Com base na busca por termos funcionais usando como referência os dados de genoma de feijoeiro (*P.vulgaris* L.) disponíveis em Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), fomos capazes de encontrar seis transcritos referentes ao termo ‘NAC’ e 90 transcritos referentes ao termo ‘NAM’. De fato, a busca por motivos conservados indica a presença do domínio conservado NAM nos 90 transcritos selecionados, e esta parece ser a característica principal da maior parte dos genes descritos como pertencentes à família NAC encontrados na literatura (OOKA et al., 2003; OLSEN et al., 2005; FANG et al., 2008; PURANIK et al., 2012).

Tomando-se a homologia com sequências de genes classificados como pertencentes à família NAC encontrados na literatura (Anexo B – Figura Suplementar B.3) foi possível a classificação filogenética dos transcritos selecionados em feijoeiro em onze subgrupos (ou subfamílias) (Figura 4.1): *PvNAC* – composto por sequências que retornaram das buscas em Phytozome pelo termo ‘NAC’ e que não apresentam o motivo (NAM) em sua estrutura, compartilhando apenas o motivo 5 (Tabela 4.2 e Figura 4.2) com as demais sequências do banco de dados; *Grupo VI* - ao lado do grupo *PvNAC*, são aquelas que apresentaram maior variação em termos de composição de motivos, sendo que os motivos 13, 15, 7 e 10 aparecem somente nesse grupo (Tabela 4.2 e Figura 4.2); *Grupo II* – apontado por Fang et al. (2008) como um grupo em *O. sativa* com apenas dois membros e com homologia ao gene *SENU5* associado ao processo de senescência em *S. lycopersicum* (JOHN et al., 1997) e são as únicas a apresentarem o motivo 14 (Tabela 4.2 e Figura 4.2); *Grupo III* – este é o segundo maior grupo formado e contém a sequência *NAM32* descrita por Recchia et al. (2013) como induzida em BAT 477 durante a seca, além de possuir alta homologia com outros genes descritos como envolvidos em processos de tolerância a estresses abióticos, *SNAC2* (HU et al., 2008), estresses bióticos,

*ANAC055* e *ANAC019* (BU et al., 2008) e apoptose, *OsNAC4* (TAGA et al., 2009); *Grupo I* – foi o grupo mais abundante contendo 43 das sequências e apresentando a mesma composição de motivos que o grupo III (Tabela 4.2 e Figura 4.2) e devido à homologia com grupos distintos de genes *NAC* descritos na literatura foi subdividido em seis subgrupos: *Grupo I 1* (*NAC1*), *Grupo I 2* (*NAC2*), *Grupo I 4 e 3* (*GRAB/CUC*), *Grupos 5.1, 5.2 e 5.3* (*OsNAC7* de *O. sativa*) sendo que *Grupo 5.1* – foi o único a apresentar um motivo conservado (11) em sua porção C-terminal.

Tabela 4.2 – Motivos identificados na família de genes *NAC* de feijoeiro.

ID	<i>E value</i>	Motivo	Aminoácidos conservados do motivo
1	1.3e-2160	NAM	GEKEWYFFCPRDRKYPNGARTNRATAAGYWKATGKDKPIYC
2	2.0e-1307	NAM	VFYKGRAPKGEKTNWIMHEYR
3	1.4e-956	NAM	LPPGFRFHPTDEELV
4	3.4e-1025	NAM	HYLCRKVAGQPIPVDIIEVDLYKCEPWD
5	2.0e-498	-	RQDEWVLCRIFKKG
6	2.4e-277	-	GHKCIGMKKTL
7	6.8e-273	NAM	IDEFIPTLEGENGICYTHPEKLPVSKDGLIRHFFHRPSKAYTT GTRKRR
8	8.2e-079	NAC	KNILFFISKPDVFKSPTSPTYIIFGEAKIEDLSSQLQTQAAQQFK MPDV
9	1.4e-068	UBA	DDEEVDETGVDPHDIDLVMQAGVSRKAVKALKTHNGDIV GAIMELT
10	1.6e-060	-	VHTDEQGGETRWHKTGKTRPV
11	3.7e-047	-	QVTDWRALDKFVASQLSQE
12	3.7e-043	-	SPCWYDDQVSFMQDMSPMRISQPNAPYHQYPCKKELDL
13	3.6e-026	-	RTCPNCGHHIECQDQ
14	5.3e-025	NAM	LNGKALAEQNQWYYSRRTENRVTGNGYW
15	8.0e-025	-	HLEAKVCCDNHKLHP

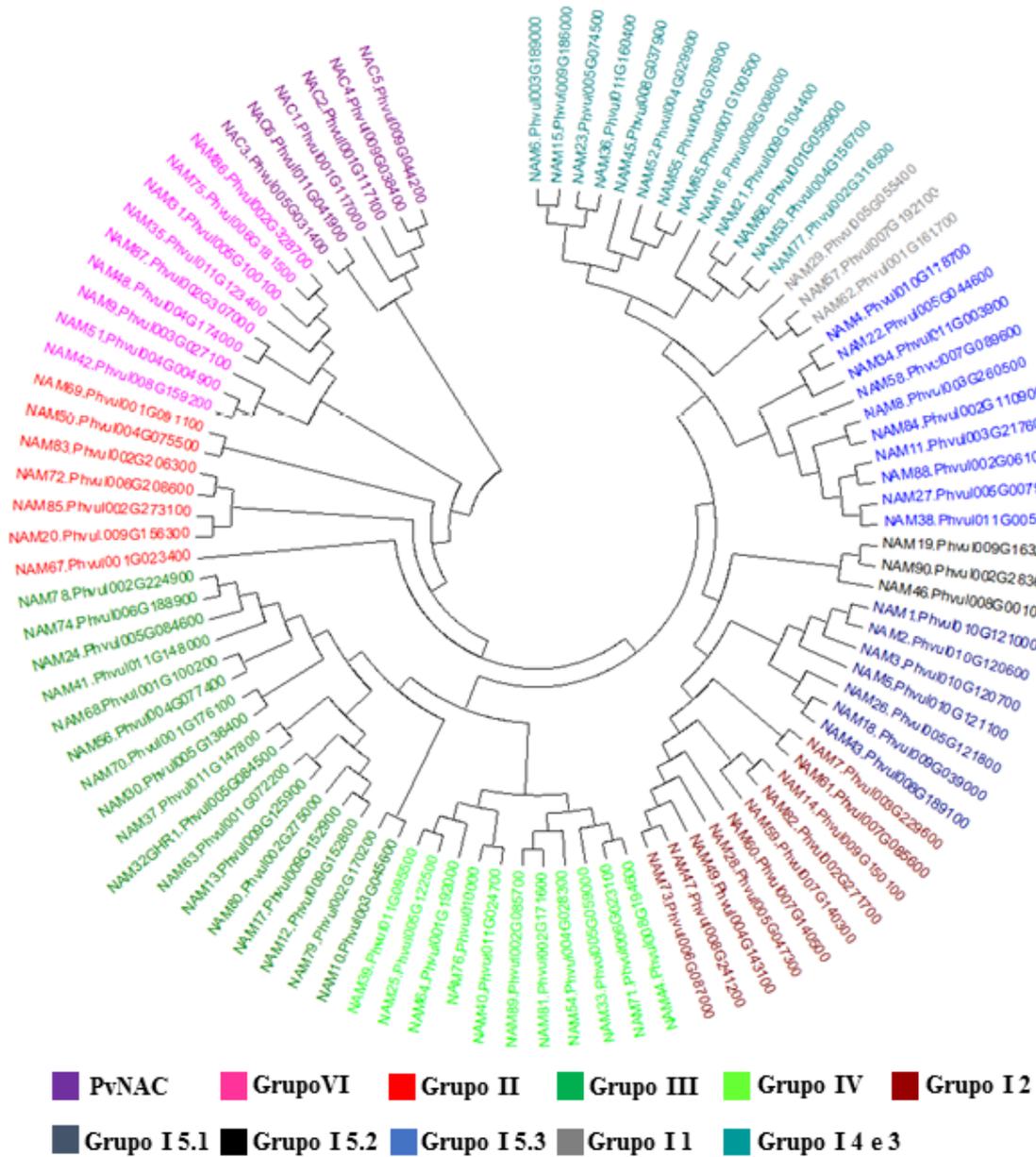


Figura 4.1 – Análise filogenética de genes pertencentes a família NAC em feijoeiro (*P. vulgaris* L.). Onze subgrupos foram descritos com base em alinhamento com seqüências descritas para outras espécies de plantas (*O. sativa*, *A. thaliana* e *G. max*) e presença de motivos conservados.

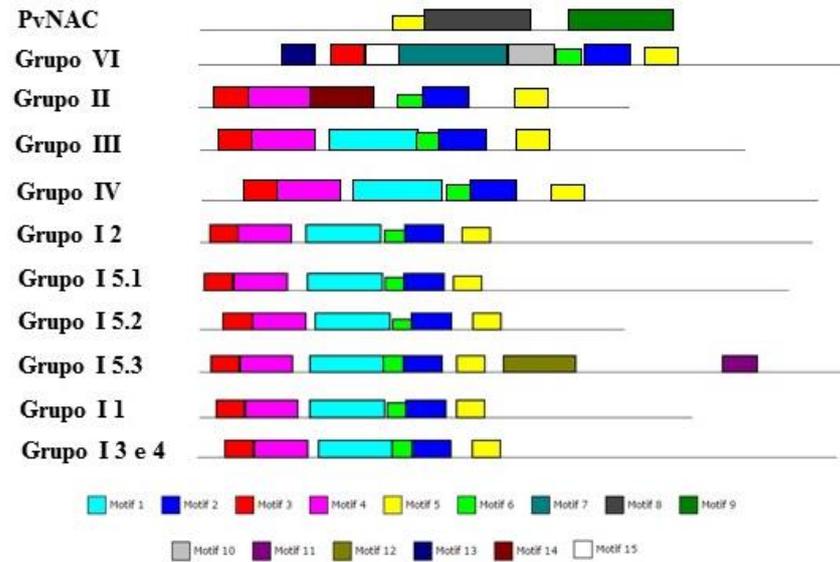


Figura 4.3 – Classificação dos subgrupos de genes NAC em feijoeiro com base na distribuição padrão de motivos conservados.

O alinhamento das 96 sequências com base nos domínios funcionais permitiu a identificação dos cinco domínios extremamente conservados da porção N-terminal (A, B, C, D e E) e a região C-terminal, porção TRR variável. A Figura 4.4 mostra uma fração do arquivo de alinhamento (a termos de ilustração).

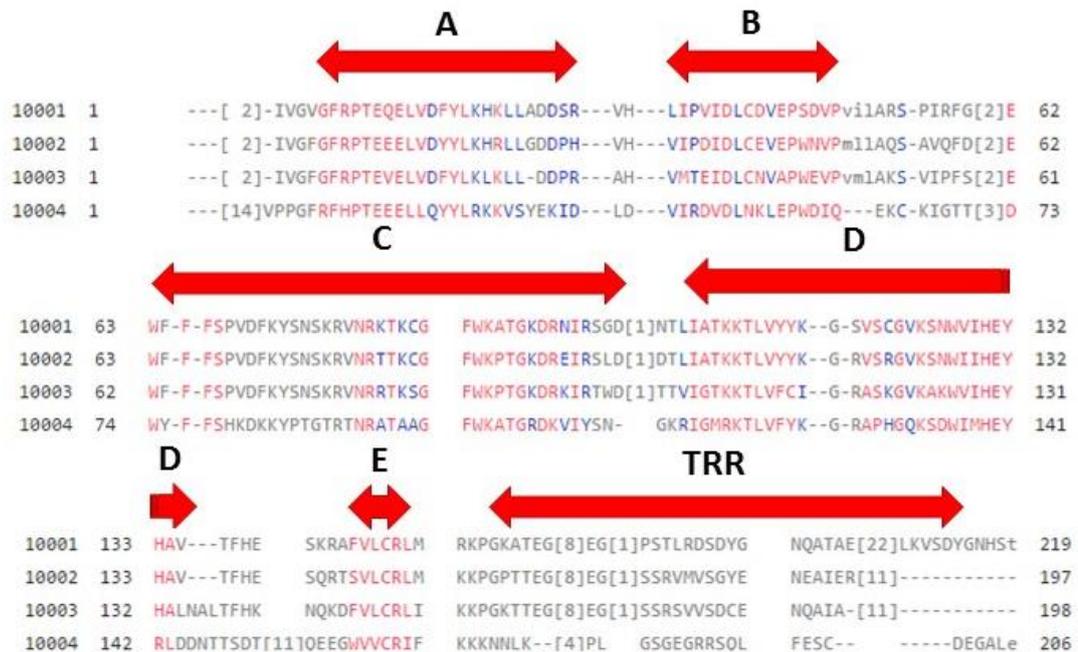


Figura 4.4 – Alinhamento dos domínios funcionais contendo quatro (das 96) sequências de genes da família NAC de feijoeiro. Domínios altamente conservados da porção N-terminal (A, B, C, D e E) e porção TRR C-terminal altamente variável.

O mapeamento *in silico* das sequências demonstrou uma ampla distribuição dos genes NAC em todos os cromossomos de feijoeiro. Dentre as 96 sequências, somente NAM 76 (Phvul010000) não foi mapeada visto que esta sequência está localizada em um dos *Scaffolds* ainda não mapeados do genoma de feijoeiro (Figura 4.5). Os cromossomos 1, 2, 5 e 9 foram aqueles que concentraram o maior número de sequências. O cromossomo 10 foi o que apresentou menor número de genes mapeados, sendo que os genes *NAM 1, 2, 3 e 4* parecem estar replicados em tandem. Duplicação em tandem parece ser também o caso para *NAC 1 e 2* no cromossomo 1, *NAM 59 e 60* no cromossomo 7 e *NAM 37 e 41* no cromossomo 11, porém estas observações requerem análises complementares mais robustas para serem comprovadas. Este padrão de duplicação era aguardado para *NAC 4 e NAC5*, dada a forte semelhança entre as sequências, porém, ambos são intermediados por *NAM18* no cromossomo 9.

#### **4.3.2 Parâmetros fisiológicos e de crescimento das plantas**

Este experimento serviu como base não somente para as análises que serão discutidas a seguir, mas também para todos os experimentos que serão abordados nos próximos capítulos. Dessa forma, os gráficos referentes às análises de grau de umidade do substrato, taxa de colonização das plantas por FMA, conteúdo relativo de água (RWC(%)) e comprimento radicular estarão disponíveis no Anexo B – Figura Suplementar B.1 e B.2.

Ao contrário do abordado na Sessão 3, diferenças significativas em termos de crescimento radicular não foram encontradas entre os tratamentos inoculado e não-inoculados com FMA (Figura Suplementar B.1 d). Vale lembrar que neste experimento, vasos comuns foram utilizados, enquanto no referente a Sessão 3 foram usados tubos de PVC (90X10 cm) que favorecem o crescimento longitudinal das raízes. A diferença na abordagem se deve ao fato de que este experimento faz parte de uma série (totalizando quatro no total) de experimentos em que buscávamos otimizar o máximo possível as condições de experimentação em casa de vegetação que correlacionassem da melhor forma possível a inoculação com FMA e ensaios de déficit hídrico. O experimento relacionado na Sessão 3 surgiu como uma sugestão feita em exame de Qualificação e foi o quinto nesta série de experimentos.

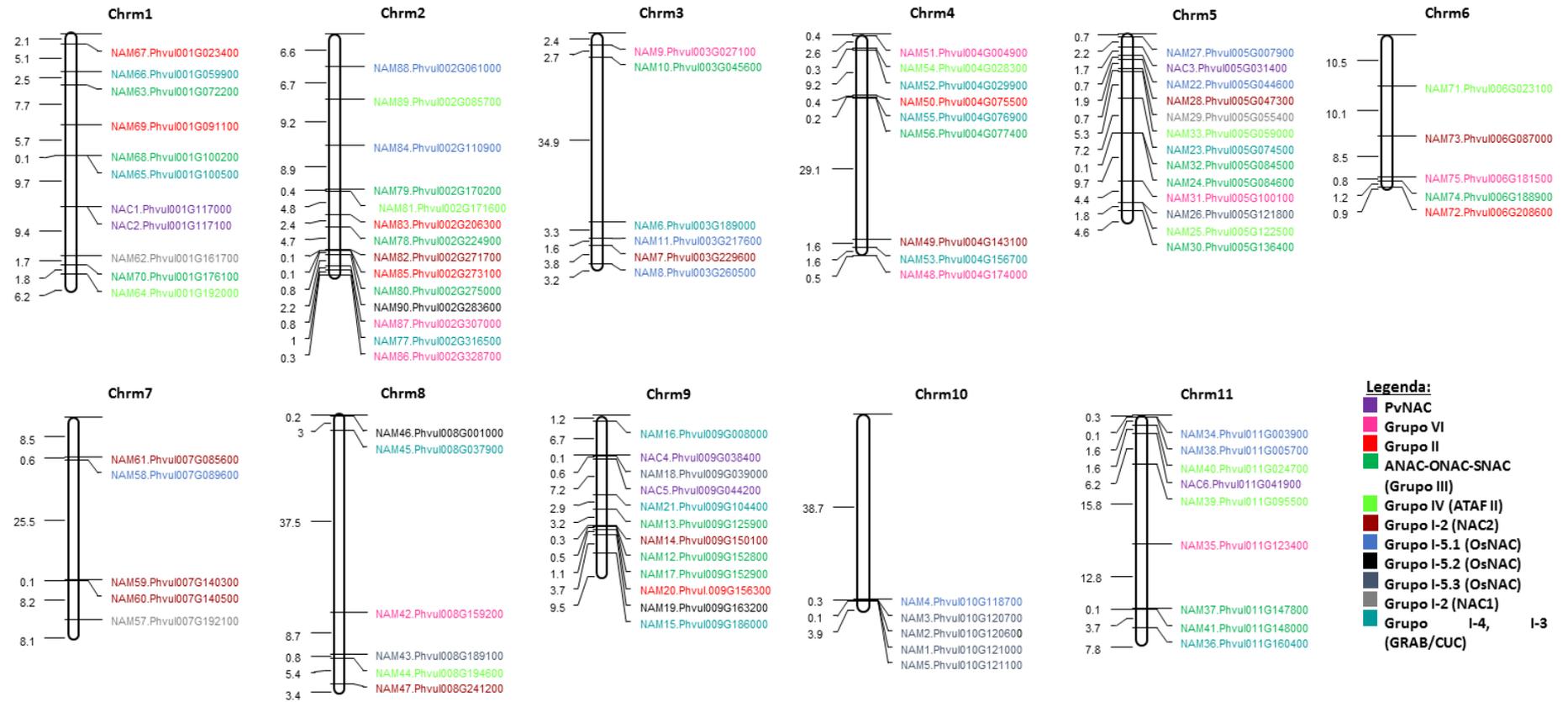


Figura 4.5 - Localização cromossômica dos 96 genes pertencente à família NAC no genoma de feijoeiro (*P. vulgaris* L.). Posição determinada em pb no genoma de referência de feijoeiro.

Da mesma forma, diferenças nos padrões de crescimento das plantas, comumente associadas à micorrização com FMA não foram detectados em nenhum de nossos experimentos (Figura Suplementar B.2). Plantas colonizadas por FMA geralmente apresentam uma melhor taxa de crescimento em virtude de melhorias associadas a absorção de nutrientes, porém em situações limítrofes como vasos, onde a disponibilidade de nutrientes se torna escassa e o uso de substrato estéril inibi o fator competição encontrado em solos naturais, que limitam o crescimento populacional dos microrganismos presentes na comunidade rizosférica, tais benefícios advindos da simbiose podem ser comprometidos.

Taxas de colonização se mantiveram adequadas (Figura Suplementar B.1 b) e os valores de RWC(%) estão dentro dos parâmetros esperados para ensaios de déficit hídrico em casa de vegetação (Figura Suplementar B.1 c).

#### 4.3.3 Análise temporal de expressão gênica de genes *NAC* em feijoeiro

Para nossas análises de RT-qPCR envolvendo três tempos de coleta ao longo da progressão do déficit hídrico em plantas (48, 72 e 96 horas) foram selecionados dez genes da família *NAC* de feijoeiro: *PvNAC 3*, *PvNAC4*, *PvNAC5* e *PvNAC 6*, em nossas análises pertencentes a um grupo distinto (*PvNAC*) dos demais 90 genes *NAM*; *NAM 60*, ortólogo de *NAC2* de *Arabidopsis* (At5G04410) envolvido em resposta a déficit hídrico (DING et al., 2013); *NAM 45*, ortólogo a *ANAC092* de *Arabidopsis* e envolvido no processo de senescência de folhas sob indução de ABA e estresse salino (HE et al., 2005); *NAM 4*, ortólogo de *ANAC043* de *Arabidopsis* e envolvido em desenvolvimento secundário de parede celular (ZHONG; YE, 2015); *NAM 28*; e *NAM 41* e *NAM 32*, estes dois últimos pertencentes ao Grupo III, aquele que contém o maior número de ortólogos associados a processos de defesa a estresses bióticos e abióticos, sendo que *NAM 32* foi indicado por Recchia et al. (2013) como envolvido no processo de tolerância de BAT 477 a déficit hídrico. Além destes, três fatores de transcrição DREB ortólogos aos *DREB1a*, *DREB1c* e *DREB1d* de *Arabidopsis* e um descrito para feijoeiro *DREB6A* (PEREIRA, 2014), além de um fator de transcrição ABRE (*abf2*), foram selecionados para investigar as vias de sinalização ABA-dependentes e independentes. Os perfis de expressão gênica obtidos para estes genes encontram-se resumidos no Heatmap da Figura 4.6.

Sob 48 horas de indução de déficit hídrico todos os fatores de transcrição encontram-se reprimidos para tratamento contendo FMA e induzidos para a condição não-colonizada (colunas 1 e 2 da Figura 4.6), sendo que os maiores níveis de repressão foram apontados para *NAM32* (200 vezes), *NAC6* (62,5 vezes), *NAC 4* (62 vezes) e *DREB1d* (58 vezes) (Figuras 6.7 e 6.8). Entretanto, após 72 horas de déficit hídrico todos os fatores de transcrição

passam a sofrer indução de expressão gênica no tratamento inoculado e, com exceção de *DREB1a/CBF3*, essa indução será mais pronunciada do que na ausência de micorrização (colunas 2 e 3, Figura 4.6).

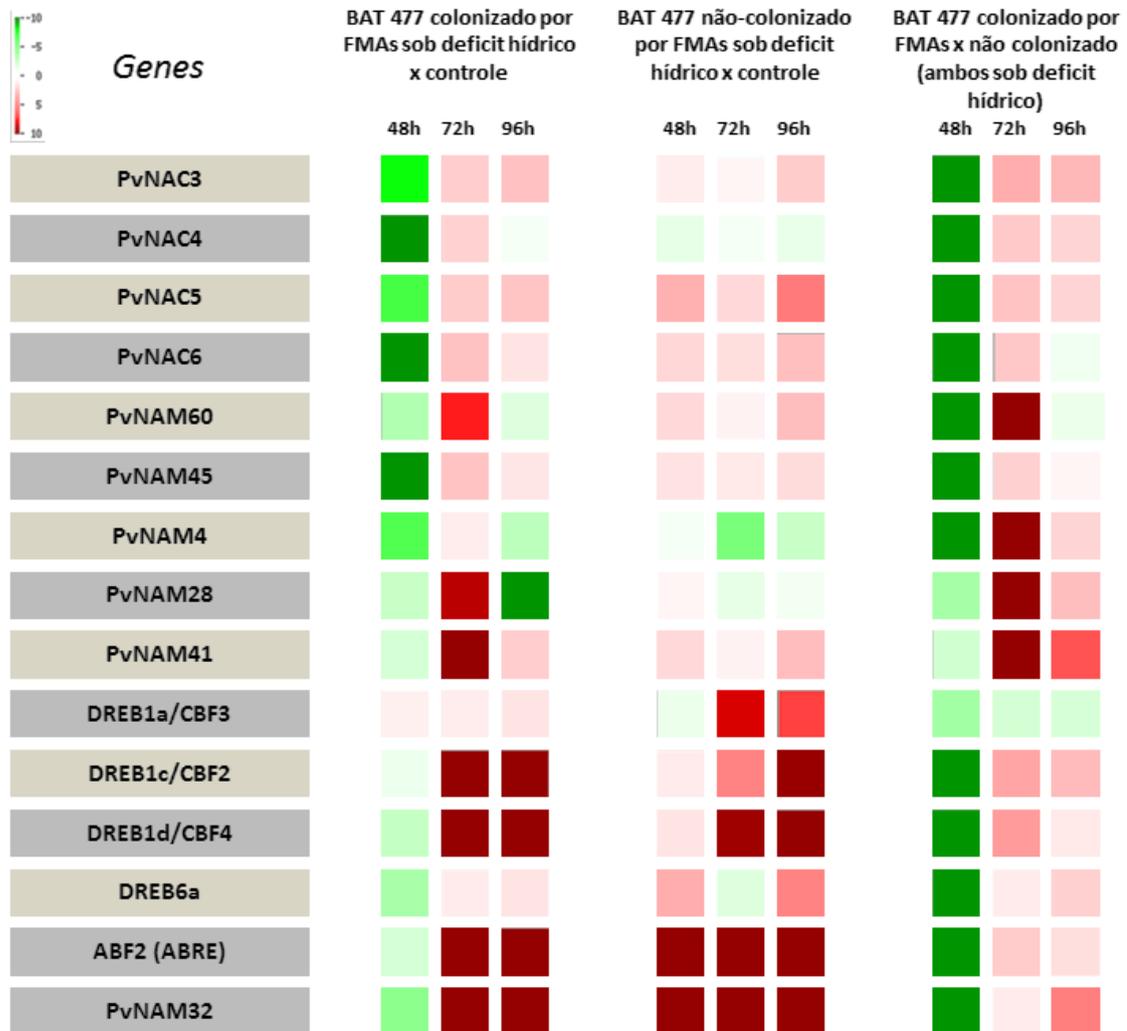


Figura 4.6 - Heat-Maps obtidos a partir de valores de expressão gênica relativa por RT-qPCR para raízes de BAT477. Os valores de expressão gênica (razão Log2) aqui representados variam de -10 (verde – reprimidos) a +10 (vermelho – induzidos). Expressão gênica relativa foi obtida contrastando-se diferentes amostras ao longo dos tempos de coleta: Coluna 1 - BAT477 colonizado por FMA sob estresse X controle micorrizado; Coluna 2 - BAT477 não-colonizado por FMA sob estresse X controle micorrizado; Coluna 3 - BAT477 micorrizado sob estresse X BAT477 não-micorrizado sob estresse.

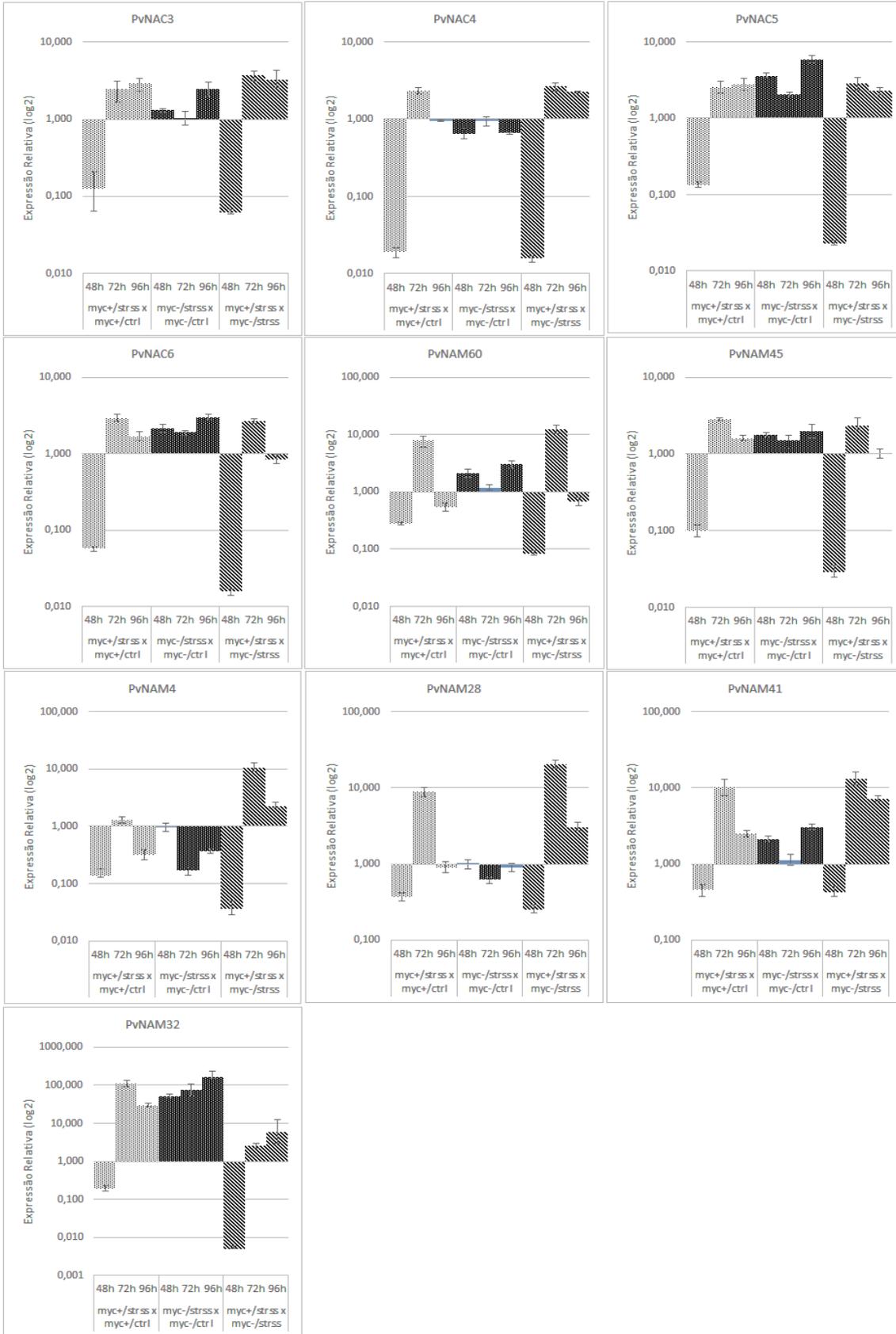


Figura 4.7 – Perfis de expressão gênica relativa (razão Log2) para os genes da família NAC. Legenda: *myc+/strs* – plantas inoculadas com FMA submetidas a déficit hídrico; *myc+/ctrl* – plantas inoculadas com FMA irrigadas regularmente (controle); *myc-/strs* – plantas não-inoculadas com FMA submetidas a déficit hídrico; *myc-/ctrl* – plantas não inoculadas com FMA irrigadas regularmente (controle).

Comparando-se os perfis de expressão gênica entre os tratamentos inoculados com FMA sob déficit hídrico e não-inoculados também sob estresse, os maiores níveis de indução de expressão gênica após 72 horas foram obtidos para os genes *NAM60* (12,26 vezes), *NAM 4* (10,5 vezes), *NAM 28* (20,46 vezes) e *NAM 41* (13,27 vezes) (Figuras 6.6 e 6.7). *NAM32* foi o fator de transcrição que em ambas as condições apresentou maiores níveis de indução (111,54 vezes para o tratamento inoculado sob seca quando comparado ao controle), porém, esta indução ocorreu para ambas as condições analisadas, independente da presença de FMA, comprovando sua importância na resposta de feijoeiro ao déficit hídrico (RECCHIA et al., 2013).

*NAM4* somente sofreu indução sob déficit hídrico em plantas micorrizadas (após 72 horas de estresse), sendo que sua repressão foi 2,27 vezes menos intensa após 96 horas, indicando uma possível exclusividade de regulação de expressão genica que deverá ser explorada com mais detalhes posteriormente em experimento de microdissecção a laser. Esta observação se aplica também a *NAC4*.

Com a exceção de *PvDREB1a/CBF3* que teve níveis bastante reduzidos de indução de expressão gênica durante os três períodos analisados, em plantas micorrizadas sob estresse todos os demais genes DREB sofreram indução após 72 horas de déficit hídrico (Coluna 3 das Figuras 4.6 e 4.8). A indução de *PvDREB1c/CBF2*, aliada à repressão de *PvDREB1a/CBF3* podem estar fortemente correlacionadas e também ser uma resposta à inoculação por FMA. O ortólogo de *DREB1a/CBF3* em *Arabidopsis* é comumente referenciado como responsivo à seca (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2001), e de fato este é o padrão de expressão gênica que podemos observar quando analisamos seus perfis de expressão em plantas não-micorrizadas sob seca em relação aos respectivos controles (Colunas 2 – Figura 25 e 33). De acordo com Novillo et al. (2004), em *Arabidopsis* o ortólogo de *PvDREB1a/CBF3* é um regulador negativo de *PvDREB1c/CBF2*, desenvolvendo um papel bastante importante no processo de tolerância das plantas ao frio, e outras fontes relacionadas de estresse abiótico. Desta forma, esta pode ser uma evidência de um mecanismo pelo qual FMA regulam a expressão de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico.

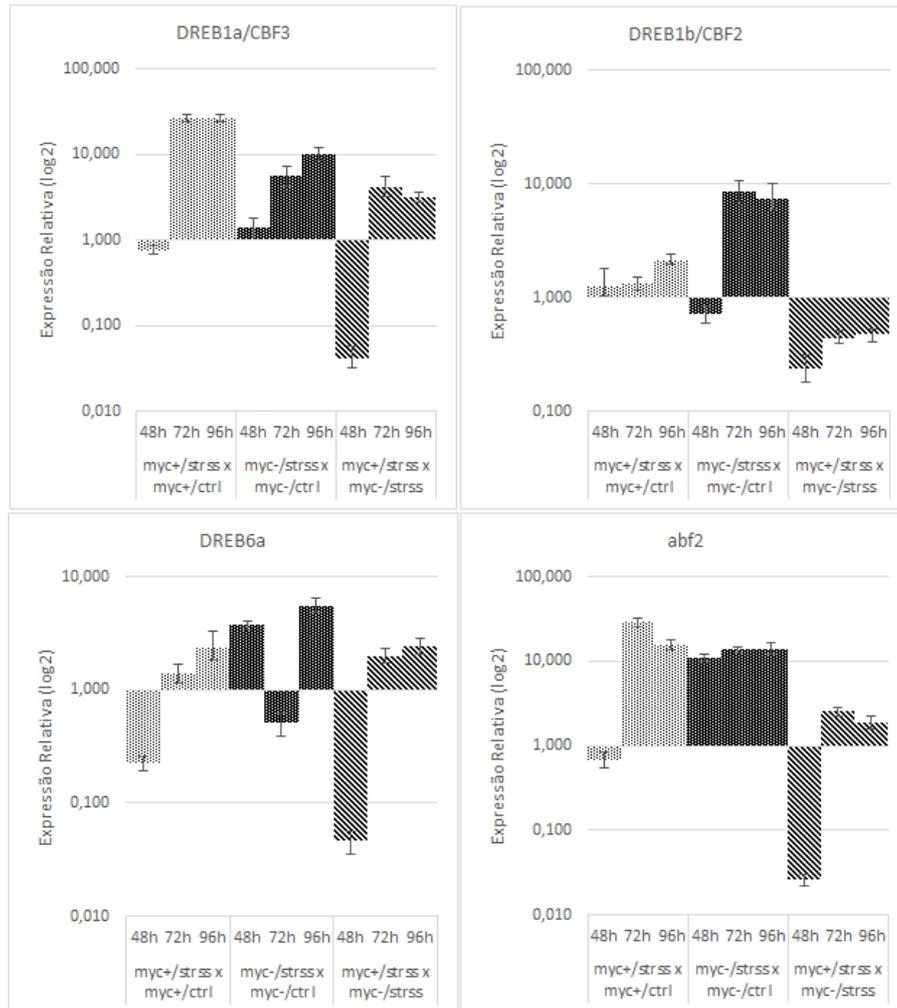


Figura 4.7 – Perfis de expressão gênica relativa (razão Log<sub>2</sub>) obtidos por RT-qPCR para os genes DREB e ABRE selecionados em feijoeiro. Legenda: myc+/strss – plantas inoculadas com FMA submetidas a déficit hídrico; myc+/ctrl – plantas inoculadas com FMA irrigadas regularmente (controle); myc-/strss – plantas não-inoculadas com FMA submetidas a déficit hídrico; myc-/ctrl – plantas não inoculadas com FMA irrigadas regularmente (controle).

A indução tanto de genes ABRE (ortólogo de *abf2* de *Arabidopsis*) pertencentes à via ABA-dependente e genes DREB da via ABA-independentes, aliados a alta regulação dos genes NAC, nos leva a acreditar que a regulação da expressão gênica por FMA em plantas sob déficit hídrico deva ser um fenômeno bastante intrincado que envolva vias bioquímicas e metabólicas bastante distintas. Como será discutido no próximo capítulo, uma análise de RNA-Seq foi realizada afim de se acessar essa ampla variação em transcritomas. Com base nesses dados de RNA-Seq foi feita uma seleção de todos os genes da família NAC caracterizados nesse estudo de acordo com aqueles que sofreram diferenças mais significativas de expressão gênica para as condições analisadas (com um índice FDR corrigido pelo valor de  $p < 0,05$ ), (Figura 4.8).

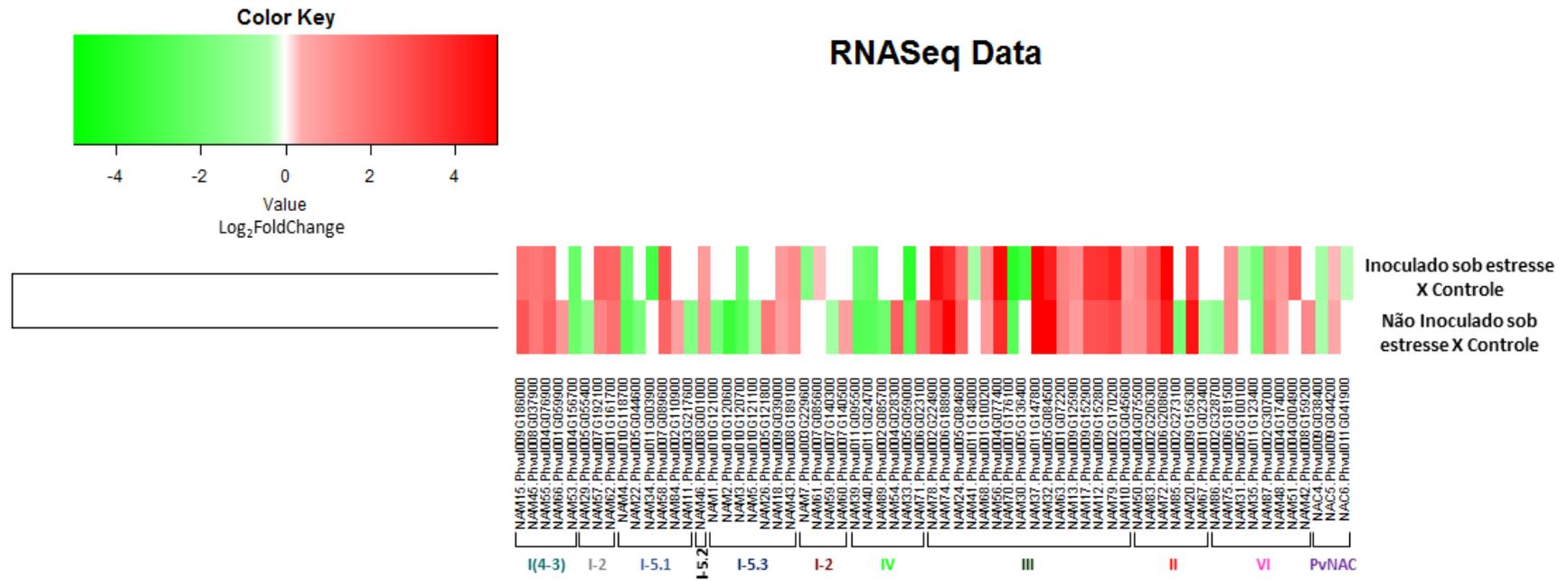


Figura 4.8 – Heatmap obtido a partir dos dados de RNASeq para 65 dos genes pertencentes a família NAC de feijoeiro caracterizados nesse estudo. A seleção dos genes diferencialmente expressos foi efetuada com base no nível de significância (FDR corrigido pelo valor de  $p < 0,05$ ) levando-se em consideração duas condições: Plantas inoculadas com FMA sob déficit hídrico (96 horas) comparadas ao controle irrigado inoculado e plantas não-inoculadas com FMA sob déficit hídrico (96 horas) comparadas ao respectivo controle irrigado não inoculado. Os transcritos foram agrupados de acordo com a caracterização adotada em nosso trabalho.

A análise do Heatmap obtido a partir dos dados de RNA-Seq nos permitiu detectar diferenças significativas nos perfis de expressão gênica de 65, do total de 96, genes pertencentes à família NAC caracterizados em nosso estudo, sendo que oito deles são regulados exclusivamente sob condições de déficit hídrico na presença de FMA e 16 são exclusivamente regulados na ausência de FMA, também na ocorrência de déficit hídrico.

#### 4.4 Conclusões

A busca e caracterização *in silico* dos genes pertencentes a família NAC em feijoeiro nos permitiu gerar uma base de dados singular sobre este grupo tão diverso de fatores de transcrição que estão associados a uma ampla gama de processos que envolvem desde a regulação do desenvolvimento até a resposta coordenada da planta a estímulos de origem biótico e abiótico. Análises de expressão gênica por RT-qPCR dos fatores de transcrição selecionados indicaram que plantas colonizadas por FMA tendem a responder de forma mais tardia, e ao mesmo tempo, mais intensa ao déficit hídrico (níveis maiores de indução), em relação às plantas não-inoculadas também sob estresse. *PvNAM4* e *PvNAC4* foram induzidos após 72 horas de déficit hídrico somente em plantas micorrizadas. Além disso, as análises de RNASeq apontam para a regulação exclusiva de oito transcritos em plantas micorrizada sob déficit hídrico de 96 horas, evidenciando a existência de mecanismos próprios de regulação da expressão gênica durante a resposta ao déficit hídrico em plantas sob influência de FMA. As análises dos fatores de transcrição DREB e ABRE deixam evidente a importância de vias tanto ABA-dependentes, quanto ABA-independentes na regulação dos processos de resposta ao estresse em plantas micorrizadas.

#### Referências

BAILEY, T. L.; BODEN, M.; BUSKE, F. A.; FRITH, M.; GRANT, C. E.; CLEMENTI, L.; REN, J.; LI, W. W.; NOBLE, W. S. MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, W202-208, 2009.

BAILEY, T. L.; GRIBSKOV, M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 48–54, 1998.

BORGES, A.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, New York, v. 31, n. 5, p. 827–838, 2012.

BU, Q.; JIANG, H.; LI, C.-B.; ZHAI, Q.; ZHANG, J.; WU, X.; SUN, J.; XIE, Q.; LI, C. Role of the Arabidopsis thaliana NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. **Cell Research**, London, v. 18, n. 7, p. 756–767, 2008.

CERVANTES-GÁMEZ, R. G.; BUENO-IBARRA, M. A.; CRUZ-MENDÍVIL, A.; CALDERÓN-VÁZQUEZ, C. L.; RAMÍREZ-DOURIET, C. M.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; VILLALOBOS-LÓPEZ, M. Á.; VALDEZ-ORTÍZ, Á.; LÓPEZ-MEYER, M. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis-Induced Expression Changes in Solanum lycopersicum Leaves Revealed by RNA-seq Analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, p. 1–14, 2015. doi:10.1007/s11105-015-0903-9.

CHEN, M.; XU, Z.; XIA, L.; LI, L.; CHENG, X.; DONG, J.; WANG, Q.; MA, Y. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 121–135, 2009.

CHRISTIANSON, J. A.; DENNIS, E. S.; LLEWELLYN, D. J.; WILSON, I. W. ATAF NAC transcription factors: regulators of plant stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 5, n. 4, p. 428–432, 2010.

ERNST, H. A.; OLSEN, A. N.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. **EMBO Reports**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 297–303, 2004.

FANG, Y.; YOU, J.; XIE, K.; XIE, W.; XIONG, L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 280, n. 6, p. 547–563, 2008.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; MARUYAMA, K.; SEKI, M.; HIRATSU, K.; OHME-TAKAGI, M.; TRAN, L. S. P.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. **Plant Journal**, Chichester, v. 39, n. 6, p. 863–876, 2004.

HAO, Y. J.; SONG, Q. X.; CHEN, H. W.; ZOU, H. F.; WEI, W.; KANG, X. S.; MA, B.; ZHANG, W. K.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. Plant NAC-type transcription factor proteins contain a NARD domain for repression of transcriptional activation. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 5, p. 1033–1043, 2010.

HE, X. J.; MU, R. L.; CAO, W. H.; ZHANG, Z. G.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. **Plant Journal**, Chichester, v. 44, n. 6, p. 903–916, 2005.

HOG EKAMP, C.; KÜSTER, H. A roadmap of cell-type specific gene expression during sequential stages of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. **BMC genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 306, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 35, p. 12987–12992, 2006.

HU, H.; YOU, J.; FANG, Y.; ZHU, X.; QI, Z.; XIONG, L. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 67, n. 1-2, p. 169–181, 2008.

JENSEN, M. K.; KJAERGAARD, T.; NIELSEN, M. M.; GALBERG, P.; PETERSEN, K.; O'SHEA, C.; SKRIVER, K. The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. **The Biochemical Journal**, London, v. 426, n. 2, p. 183–196, 2010.

JOHN, I.; HACKETT, R.; COOPER, W.; DRAKE, R.; FARRELL, A.; GRIERSON, D. Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, n. 4, p. 641–651, 1997.

KJAERGAARD, T.; JENSEN, M. K.; CHRISTIANSEN, M. W.; GREGERSEN, P.; KRAGELUND, B. B.; SKRIVER, K. Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 286, n. 41, p. 35418–35429, 2011.

LIU, R. H.; MENG, J. L. MapDraw: a Microsoft Excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. **Hereditas**, Beijing, v. 25, n. 3, p. 317–321, 2003.

MANTHEY, K.; KRAJINSKI, F.; HOHNJEC, N.; FIRNHABER, C.; PÜHLER, A.; PERLICK, A. M.; KÜSTER, H. Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during Medicago truncatula root endosymbioses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 17, n. 10, p. 1063–1077, 2004.

NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1819, n. 2, p. 97–103, 2012.

NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

NOVILLO, F.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; SALINAS, J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 11, p. 3985–3990, 2004.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. A.; LEGGIO, L. L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 79–87, 2005.

OOKA, H.; OOKA, H.; SATOH, K.; SATOH, K.; DOI, K.; DOI, K.; NAGATA, T.; NAGATA, T.; OTOMO, Y.; OTOMO, Y.; MURAKAMI, K.; MURAKAMI, K.; MATSUBARA, K.; MATSUBARA, K.; OSATO, N.; OSATO, N.; KAWAI, J.; KAWAI, J.; CARNINCI, P.; CARNINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; HAYASHIZAKI, Y.; SUZUKI, K.; SUZUKI, K.; KOJIMA, K.; KOJIMA, K.; TAKAHARA, Y.; TAKAHARA, Y.; YAMAMOTO, K.; YAMAMOTO, K.; KIKUCHI, S.; KIKUCHI, S. Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. **DNA Research**, Oxford, v. 247, p. 239–247, 2003.

PEREIRA, A. C. V. Z. **Análise funcional do fator de transcrição *DREB6a* de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pela superexpressão em *Arabidopsis thaliana***. 2014. 179 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, n. 1, p. 181–200, 2012.

PURANIK, S.; SAHU, P. P.; SRIVASTAVA, P. S.; PRASAD, M. NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 369–381, 2012.

RAO, I. M.; POLANIA, J.; GARCIA, R.; BEEBE, S. Development of greenhouse soil tube method to quantify phenotypic differences among advanced lines in root development and distribution under drought stress. In: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Annual Report 2006. ProjectIP-1: Bean Improvement for the Tropics**. Cali, Colombia: CIAT, 2006. p. 19–25.

RECCHIA, G. H.; GREGORIO, D.; CALDAS, G.; LUIZA, A.; BERALDO, A. Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 4, p. 7155–7179, 2013.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. M. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 6, e45, 2009.

RUZICKA, D.; CHAMALA, S.; BARRIOS-MASIAS, F. H.; MARTIN, F.; SMITH, S.; JACKSON, L. E.; BARBAZUK, W. B.; SCHACHTMAN, D. P. Inside Arbuscular Mycorrhizal Roots – Molecular Probes to Understand the Symbiosis. **The Plant Genome**, Madison, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2013.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A.; CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; ABERNATHY, B.; BARRY, K.; BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVIATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D. L.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.B.; ROKHSAR, D.S.; JACKSON, S. A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, London, v. 46, n. 7, p. 707–13, 2014.

TAGA, Y.; TAKAI, R.; KANEDA, T.; MATSUI, H.; ISOGAI, A.; CHE, F.-S. Role of OsHSP90 and IREN, Ca<sup>2+</sup> dependent nuclease, in plant hypersensitive cell death induced by transcription factor OsNAC4. **Plant signaling & behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 8, p. 740–742, 2009.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TRAN, L.-S. P.; NISHIYAMA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. **GM Crops**, Austin, v. 1, n. 1, p. 32–39, 2010.

UDVARDI, M. K.; KAKAR, K.; WANDREY, M.; MONTANARI, O.; MURRAY, J.; ANDRIANKAJA, A.; ZHANG, J.-Y.; BENEDITO, V.; HOFER, J. M. I.; CHUENG, F.; TOWN, C. D. Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 2, p. 538–549, 2007.

USADEL, B.; POREE, F.; NAGEL, A.; LOHSE, M.; CZEDIK-EYSENBERG, A.; STITT, M. A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: A case study in the crop species, Maize. **Plant, Cell and Environment**, Chichester, v. 32, n. 9, p. 1211–1229, 2009.

WIPF, D.; MONGELARD, G.; VAN TUINEN, D.; GUTIERREZ, L.; CASIERI, L. Transcriptional responses of *Medicago truncatula* upon sulfur deficiency stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1–18, 2014.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 287–291, 1999.

YANG, S.-D.; SEO, P. J.; YOON, H.-K.; PARK, C.-M. The arabidopsis NAC transcription factor VNI2 integrates abscisic acid signals into leaf senescence via the COR/RD genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 6, p. 2155–2168, 2011.

ZHONG, R.; LEE, C.; YE, Z. H. Global analysis of direct targets of secondary wall NAC master switches in arabidopsis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 6, p. 1087–1103, 2010.

ZHONG, R.; YE, Z.-H. The Arabidopsis NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 10, n. 2, e989746, 2015.

## 5 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO SISTEMA MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO (BAT477) – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Gigaspora rosea*) SOB DÉFICIT HÍDRICO

### Resumo

A simbiose mutualística estabelecida entre plantas e Fungos Micorrízicos Arbusculares é amplamente conhecida por seus efeitos benéficos na qualidade nutricional do hospedeiro e por gerar uma melhor performance sob condições de estresses bióticos e abióticos. O feijoeiro é uma das culturas de leguminosas mais importante em todo o mundo, mas a despeito de sua enorme importância e valor cultural, 60% da produção ainda está condicionada a regiões que sofrem anualmente com episódios contínuos ou intermitentes de seca. Entretanto, a maior parte dos programas de melhoramento genético adotados para a cultura foram direcionados para aspectos fenotípicos relacionados a crescimento e aumento de produtividade e pouco foi pensado em termos de arquitetura radicular e interações simbióticas com a microbiota do solo. Em nosso estudo, a cultivar tolerante a seca BAT 477 foi avaliada em um sistema de interação com três espécies de FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata* e *G. rosea*) submetidos a um período de déficit hídrico de 96 h. A técnica de RNASeq foi empregada para a obtenção dos perfis transcricionais da planta sob estresse, comparando-se o modelo sob interação com FMA e plantas não-inoculadas. Nossos resultados indicam que apesar de BAT 477 demonstrar um forte potencial de resposta à seca (uma média de 12 mil genes foram diferencialmente expressos com nível p de significância ajustado para FRD<0,05), apenas 71 genes puderam ser elencados como significativamente induzidos/reprimidos sob influência de FMA durante a seca, entre eles: (induzidos) fatores de transcrição *bhlh95*, *bZIP*, *SRF-type* e *zinc finger HD*, a transposase *hAT*, a proteína *utp23* de pré-processamento de rRNA, *terpene synthase*, *cytokinin dehydrogenase*, duas proteases, *Glucan 1,3 β-Glucosidase*, *Glucose dehydrogenase*, uma lipase, *apoptotic ATPase* e *apg9*; (reprimidos) *RCC1*, *α/β hydrolase* e *K+antiporter*. Estes resultados oferecem uma importante contribuição para o campo das pesquisas envolvendo a influência de FMA sob o perfil de expressão gênica de plantas e apontam para a necessidade do direcionamento do foco dos programas de melhoramento do feijoeiro para aspectos referentes às interações simbióticas estabelecidas com microrganismos benéficos do solo.

Palavras-chave: BAT 477. Micorrização. RNA-Seq. Bioinformática.

## Abstract

The mutualistic symbiosis established between plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi is amply recognized by its beneficial effects on the nutritional status of the host and to offer a better performance under both biotic and abiotic conditions. Common beans are one of the most important leguminous culture in the world, but despite its huge importance and cultural value, 60% of its production is relegated to regions that suffers from continuous to intermittent drought episodes. However, the majority of breeding programs established for the culture focuses on aspects related to growth and increase in yield, with root architecture and symbiosis with beneficial microorganisms from the soil being poorly considerate. In our study, the drought tolerant cultivar BAT 477 was evaluated in an interaction system with three AMF species (*G. clarum*, *A. scrobiculata* and *G. rosea*) submitted to a water deficit regime of 96 h. The RNA-Seq technique was applied to obtain the transcriptional profiles of plants under stress, comparing AM to non-AM plants. Our results indicate that despite the great drought tolerance potencial of BAT 477 (an average of 12 thousand unigenes were differentially regulated with a statistic significance of p value adjusted to a FRD<0,05), only 71 unigenes were selected as significantly up- or downregulated by AMF under drought, among them: (upregulated) transcription factors *bhlh95*, *bZIP*, *SRF-type e zinc finger HD*, a hAT transposase, the rRNA pre-processing protein *utp23*, *terpene synthase*, *cytokinin dehydrogenase*, two proteases, *Glucan 1,3 β-Glucosidase*, *Glucose dehydrogenase*, a lipase, *apoptotic ATPase* and *apg9*; (downregulated) *RCC1*, *α/β hydrolase* and *K+antiporter*. These results offer an important contribution for the field regarding AMF influence over gene expression regulation in plants and points to a necessity of common bean breeding programs to further direct their attention into the establishment of root endosymbiosis with beneficial microorganisms from the soil.

Keywords: BAT 477. Mycorrhization. RNA-Seq. Bioinformatics.

## 5.1 Introdução

As chamadas tecnologias ‘ômicas’ e a bioinformática tem se tornado essenciais para a compreensão dos sistemas moleculares que compreendem as múltiplas funções desempenhadas por uma planta, tanto no estudo de espécies modelo, como para as espécies cultivadas (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2011). Apesar da crescente importância econômica, agrícola e cultural do feijoeiro (*P. vulgaris* L.), a demanda por investigações que integrem de forma eficaz os dados derivados de pesquisas ‘ômicas’ ainda é muito grande em relação à outras espécies de leguminosas como *G. max* e *M. truncatula*. Recentemente um consórcio entre o Departamento de Agricultura dos EUA (*US Agricultural Department*) e o *Joint Genome Institute* (JGI) tornaram público um genoma de referência do feijoeiro (linhagem G 19833) que mapeou 473 Mb do genoma de 587 Mb e ancorou 98% dessas sequências em seus 11 cromossomos (SCHMUTZ et al., 2014). Este fato abriu um novo capítulo nas pesquisas com feijoeiro revelando um novo conjunto de genes candidatos bastante úteis para a adoção em programas de melhoramento genético da cultura visando a aquisição de tolerância a estresses abióticos (WU et al., 2014, ZADRAŽNIK et al., 2013; BADOWIEC; WEIDNER, 2014; YANG et al., 2013).

Técnicas de biologia molecular vêm sendo aplicadas com o objetivo de investigar os diversos processos envolvidos na simbiose com FMA, permitindo a identificação e caracterização de genes que são importantes para essa interação. Um considerável conjunto de genes é diferencialmente expresso durante o estabelecimento da simbiose e revelam que não somente o transporte de nutrientes, mas também respostas a estímulos bióticos e abióticos e de desenvolvimento da planta possam ser regulados, indicando uma profunda reprogramação molecular em raízes colonizadas (SALVIOLI; BONFANTE, 2013). Dados de transcritomas suportam a ideia de que sob a influência de FMA, plantas acabam por ativar uma ampla reprogramação das suas principais vias metabólicas regulatórias (BONFANTE; GENRE, 2010).

Poucos estudos envolvendo análises de expressão gênica foram relatados para o modelo de interação feijoeiro-FMA. Análises de expressão gênica revelaram que a indução dos genes de defesa *chitinase*, *b-1,3-glucanase* e *phenylalanine ammonia-lyase* detectados na interação patogênica com *Fusarium solani*, tiveram pouca ou nenhuma alteração na interação com *Glomus mossae* indicando a ausência de elicitores ou a presença de supressores de defesa (MOHR et al., 1997). Arthikala et al. (2013) demonstraram que o gene *PvRbohB* (NADPH oxidase) é altamente induzido em raízes colonizadas de feijoeiro e o promotor deste gene demonstrou estar ativo durante a colonização por *R. irregulares*. O silenciamento por RNAi

deste promotor no cultivar Negro Jamapa diminuiu os níveis de EROs em raízes micorrizadas da planta mutante, induzindo a formação de apressórios e conseqüentemente acerando o processo de micorrização. Aroca, Porcel e Ruiz-Lozano (2006) avaliaram os perfis de expressão gênica de quatro aquaporinas de feijoeiro *PvPIP1,1*, *PvPIP1,2*, *PvPIP1,3* e *PvPIP2,1* na cultivar Borlotto colonizadas por *G. intraradices* e detectaram alterações significativas nos perfis de expressão destes genes em condições de seca, frio e alta salinidade.

Em um estudo que visava a caracterização do transcrito de raízes do genótipo tolerante ao déficit hídrico em feijoeiro BAT 477 comparado ao genótipo suscetível IAC-Carioca 80SH, Recchia et al. (2013) encontraram 1120 unigenes relativos ao processo de adaptação do genótipo tolerante à seca, dentre eles: fatores de transcrição (NAC, DREB, ABRE, WKRY, bZIP, MYB), transportadores transmembranares tais como aquaporinas, bombas de K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> e transportadores de Ca<sup>2+</sup>, osmoreguladores (proteínas LEA, desidrinas, cadeias peptídicas ricas em prolina), e proteínas associadas a proteção (*Heat-shock proteins*, chaperonas) e degradação (ubiquitinas). Estes resultados comprovaram o potencial do cultivar BAT 477 para adoção como modelo de feijoeiro em estudos de déficit hídrico.

RNA-Seq tem se revelado uma ferramenta bastante interessante para a caracterização de transcritos devido ao seu alto potencial em revelar sítios de *splicing* alternativo, novos genes e transcritos, variações genômicas estruturais e principalmente medir com extrema precisão os diferentes níveis de expressão gênica de uma amostra (TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009). No presente trabalho, a tecnologia de RNA-Seq foi empregada para comparar os diferentes perfis de expressão gênica do nosso modelo de interação BAT 477 – FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) durante a ocorrência de um déficit hídrico de 96 horas simulado em casa de vegetação.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Desenho experimental/ Ensaio de déficit hídrico/ Taxa de colonização das plantas por FMA**

As doze amostras de tecido radicular utilizadas na construção das bibliotecas de cDNA para o sequenciamento de RNA-Seq derivaram do mesmo ensaio em casa de vegetação descrito na Sessão 5.4.1. Análises referentes ao padrão de crescimento e parâmetros fisiológicos das plantas, bem como taxas de colonização por FMA, encontram-se disponíveis na Sessão 5.5.2 e no Anexo B.

### 5.2.2 Extração de RNA total e preparo das bibliotecas de cDNA para RNA-Seq

Foram selecionadas para as análises de RNA-Seq 12 amostras de tecido radicular referentes aos quatro tratamentos (em triplicatas biológicas): (i) plantas de BAT 477 inoculadas sob déficit hídrico (myc+/seca); (ii) plantas de BAT 477 inoculadas controle irrigado (myc+/controle); (iii) plantas de BAT 477 não-inoculadas sob déficit hídrico (myc-/seca); (iv) plantas de BAT 477 não-inoculadas controle irrigado (myc-/controle). Foram consideradas as amostras expostas a 96 horas de déficit hídrico.

Para a extração de RNA total das raízes foi utilizado o protocolo do kit TRIzol® Reagent (Invitrogen) contendo modificações. Foram adicionados a cada 100 mg de amostra de tecido radicular macerado 1 ml de Trizol. A mistura foi incubada por 5 min e centrifugada a 14000 g, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e adicionado 200 µL de clorofórmio e agitado por 20 s, incubado por 3 min e centrifugado a 11400 g, por 15 min e a 4°C. O sobrenadante foi transferido para igual volume de etanol 70%, misturado e transferido para uma coluna *RNAeasy spin column* (RNAEasy®Plant Mini Kit – Qiagen) da cor rosa. A coluna contendo a mistura foi centrifugada por 15 s a 8000 g e descartado o material que passou pela coluna. Foram adicionados 500 µL de tampão RPE à coluna, centrifugada a 8000 g por 15 s e descartado o material que passou pela coluna – esta etapa foi repetida mais uma vez. A coluna foi depositada sobre novo tubo, centrifugada por 2 min a velocidade máxima para a secagem. Após seca a coluna foi colocada sob tubo de 1,5 ml e adicionado 30 µL de H<sub>2</sub>O DEPC 0,1% aplicada direto na membrana. A coluna foi incubada por 1 min a temperatura ambiente e centrifugada em velocidade máxima para a eluição do RNA.

As amostras foram quantificadas e analisadas quanto à qualidade (*RIN numbers*) e integridade das moléculas de RNA utilizando o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). As amostras para quantificação de RNA total foram preparadas a partir de RNA 6000 Nano LabChip® Kit (Agilent Technologies). O software 2100 expert foi utilizado para plotar os dados de intensidade de fluorescência pelo tempo de migração das moléculas obtendo-se os eletroferogramas para cada amostra. Baseado na razão de migração dos RNA ribossomais 18S e 28S, os RINs individuais foram obtidos utilizados para averiguar a presença ou ausência de produtos de degradação. Dados de densitometria também foram obtidos.

Para o preparo das amostras de RNA para o sequenciamento foi utilizado o kit TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit v2 (illumina® Sequencing). Resumidamente, a partir das amostras de RNA total com até 100 ng, mRNA foi purificado utilizando-se iniciadores poli-T marcados. Esse material foi então quimicamente fragmentado e convertido em cDNA fita única (sscDNA) utilizando-se primers hexâmeros aleatórios. A fita complementar de cDNA foi então

sintetizada e fragmentada com o auxílio de endonucleases e. Uma base ‘A’ foi então adicionada às extremidades cegas dos fragmentos para a ligação dos adaptadores. Cada adaptador contém uma base ‘T’ ligada à extremidade 3’ oferecendo assim uma forma de ligação por complementariedade. Os adaptadores (*Rd1 SP – P5* e *Rd2 SP – P7*) possuem o complemento completo para os sítios de hibridização dos primers para sequenciamento. Seguidos das etapas de desnaturação e renaturação, nossas amostras foram sequenciadas de forma a ter uma amostra por *Lane*, desta forma, duas corridas, seis cada pela plataforma HiScan<sup>TM</sup>Sq System (illumina®).

Para a clusterização foi utilizado o kit TruSeq® PE Cluster Kit v3 (para cBot – HiSeq/HiScan SQ) seguindo-se instruções do fabricante. Resumidamente, as bibliotecas são ligadas por complementariedade a adaptadores de oligonucleotídeos aderidos à superfície da ‘*flow-cell*’. As amostras são copiadas a partir do primer hibridizado através de extensão pela região 3’ utilizando DNA polimerase de alta-fidelidade. Estas cópias são amplificadas isotérmicamente criando clusters clonais de ~1000 cópias cada, prontos para o sequenciamento. A reação de sequenciamento foi conduzida utilizando o kit TruSeq<sup>TM</sup> SBS kit v3 (200 Ciclos) (para HiSeq/HiScan SQ) seguindo-se instruções do fabricante.

### 5.2.3 Pipeline para as análises de bioinformática

A obtenção dos dados brutos de sequenciamento *paired-end* gerados pelo HiScan<sup>TM</sup>Sq System (illumina®) foi realizada por intermédio do programa CASAVA 1.8.2 (fornecido pela illumina®) que gera o *base call* dos dados brutos e os transforma em reads no formato *fastq* acompanhados dos scores de qualidade phred ( $\geq 20$ , médio 36). Os reads foram avaliados utilizando-se o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/publications.html>). A filtragem dos reads de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa SeqyClean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean>), utilizando como cutoff bases com qualidade inferior a 24QScore. A base de dados de contaminantes usada foi a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Após filtragem, reads com comprimento inferior a 65 bp foram removidos.

A versão sem mascaramentos (*unmasked*) do genoma de feijoeiro disponível em Phytozome foi utilizada para as análises de mapeamento (<http://genome.jgi.doe.gov/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=PhytozomeV10>). A indexação do genoma foi realizada utilizando a ferramenta Bowtie 2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). O mapeamento individual das amostras foi realizado através do pacote TopHat (TRAPNELL; PACHTER; SALBERG, 2009) utilizando-se os ambos os arquivos *paired-end*, o genoma indexado e os arquivos *gff* de anotação disponíveis em Phytozome.

A montagem dos transcritos em relação aos arquivos de mapeamento individuais foi obtida a partir da ferramenta cufflinks do pacote Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010), utilizando-se o mesmo arquivo *gff* de anotação para referência. Os arquivos individuais de montagem dos transcriptomas foram unidos através da ferramenta cuffmerge utilizando-se o arquivo inicial *gff* de anotação para a padronização dos termos de referência (IDs – identificadores). Este arquivo foi então comparado ao arquivo inicial de anotação utilizando-se a ferramenta cuffcompare para a produção de um arquivo único de GTF de referência para as nossas condições de experimentação (transcritos novos/ já anotados, novas variantes de splicing, transcritos localizados em um intron).

Esse arquivo foi usado como a anotação oferecido ao script do HTSeq-count v.05.4.p2 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/index.html>) para extração de contagens brutas dos reads. Para obtenção dos DEGs (*differentially expressed genes* - genes diferencialmente expressos), após obtenção das contagens, os grupos foram analisados usando o *script* dentro do programa DESeq2 (LOVE; ANDERS; HUBER, 2013), um pacote do R/Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). Dentro do programa DESeq2 os dados foram normalizados pelo ‘*size factor*’ e foi realizado o teste binomial negativo de expressão para a remoção dos transcritos com contagens normalizadas (ou *baseMean*) inferiores ao valor 5. Sobre o teste foi aplicada a correção de FDR- (<0,05) Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) para múltiplos testes a fim de evitar os erros tipo I, ou seja, os falsos positivos.

A anotação dos DEGs referentes a cada tratamento foi obtida através da função blastx com cutoff 1e-10 (pacote blast+ - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640/>) utilizando como referência a base de dados *greenplant* do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), data: 12/11/2013). A classificação funcional pelos termos de ontologia gênica (GO) foi feita através do programa Blast2GO (CONESA et al., 2005) a partir de 20 hits do Blast para cada contig e seguindo a função *GOSlim* para plantas. O teste de enriquecimento foi feito no próprio B2GO. A anotação obtida por blastx e *GOSlim* foi utilizada como referência e para cada tratamento foi

criado um test-set com base nos DEGs, desta forma foi possível criar, utilizando FDRs bastante rigorosos (0,01) e o teste *Fisher-2 tailed*, os gráficos de classes funcionais enriquecidas em cada tratamento. As listas de DEGs foram submetidas a uma anotação complementar a fim de se classificar funcionalmente os 100 genes mais diferencialmente expressos em cada tratamento através da ferramenta Phytomine do Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/phytomine/begin.do>). As anotações foram validadas através da busca por motivos conservados na base de dados do Pfam através da ferramenta Motif Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>).

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Quantificação e qualidade das amostras de RNA-total, pré-processamento e montagem das sequências

Quatro bibliotecas de RNA-Seq foram construídas a partir do sequenciamento *paired-end* das triplicatas biológicas referentes aos quatro tratamentos: Myc+/seca, Myc+/ctrl, Myc-/seca e Myc-/ctrl. Os sequenciamentos geraram *reads* de em média 101 pb, com conteúdo de GC de 45% e valor Phred = 36 (Anexo C). Após a filtragem dos reads de menor qualidade e a remoção de adaptadores e vetores a quantidade média de reads para cada biblioteca foi: 21.611.562 para myc+/seca; 16.855.943 para myc+/ctrl; 22.664.734 para myc-/strss; e 20.247.646 para myc-/ctrl (Tabela 5.1). A taxa média de alinhamento dos reads de cada amostra em relação ao genoma de referência de *P. vulgaris* foi: 74.33 % para myc+/seca; 90.47% para myc+/ctrl; 89.08% para myc-/seca; e 94.71% para myc-/ctrl (Tabela 5.1).

### 5.3.2 Análise de expressão gênica diferencial

As bibliotecas individuais de RNA-Seq foram agrupadas em *bulks* utilizando-se o pacote estatístico DESeq2 (LOVE et al., 2013). Os valores normalizados de abundância de reads alinhados aos respectivos transcritos de cada biblioteca foram utilizados para as análises de expressão gênica diferencial comparando-se os quatro tratamentos. Três perfis de expressão gênica foram avaliados: P1 – Myc+Seca / Myc+Ctrl; P2 – Myc-Seca/Myc-Ctrl; e P3 – Myc+Seca / Myc-Seca. Os DEGs (genes diferencialmente expressos) foram selecionados a partir dos valores de padj, valores de significância ajustados para testes múltiplos pelo modelo de Benjamin-Hochberg que controla as taxas de falso-positivos utilizando um  $FDR < 0,05$  (*FDR – false Discovery rate*). No total, para P1 foram obtidos 12.086 DEGs,

para P2, 11.938 DEs, e para P3 apenas 71 DEs. A elevada quantidade de DEGs com elevada significância estatística obtidos para P1 e P2 podem ser visualizados pela análise de *MA plot* (Figura 5.1). As Tabelas 7.2 e 7.3 relacionam os resultados da anotação gênica e da classificação funcional dos 50 DEGs com maiores índices de padj para P1 e P2 respectivamente. Os 71 DEs obtidos para P3 estão listados na Tabela 5.3.

Tabela 5.1 – Dados referentes ao mapeamento dos reads de RNA-Seq em relação ao genoma de referência do feijoeiro disponível em Phytozome. Legenda: Myc+: plantas inoculadas com FMA; Myc-: plantas não-micorrizadas; seca: déficit hídrico de 96 horas; ctrl: controle irrigado regularmente; #: número de sequências.

Amostras	Reads mapeados	Pares alinhados	Singletons	Reads alinhados uma vez	Cufflinks reads alinhados	Alinhamento (%)
1. Myc+/seca	16240224	15381738	197718	12233750	14440406	68,32
2. Myc+/seca	20784325	19822722	161683	14858947	17966574	79,26
3. Myc+/seca	11194171	10657744	380193	3529090	8442644	75,42
1. Myc+/ctrl	3308298	3189388	7684	2524847	3018160	91,23
2. Myc+/ctrl	20769263	19861748	63571	16368282	19308757	89,46
3. Myc+/ctrl	21526552	20564488	57860	16880131	19986277	90,73
1. Myc-/seca	19785492	18882764	64386	15425096	18007546	89,06
2. Myc-/seca	21134647	20102648	40633	16549128	19578273	92,95
3. Myc-/seca	19636451	18970134	207929	9512038	13306190	85,22
1. Myc-/ctrl	18663092	17795574	34924	14860989	17351158	93,05
2. Myc-/ctrl	21083899	20098926	27041	16400413	19375721	96,80
3. Myc-/ctrl	17827473	17060856	26277	14199814	16542250	94,30

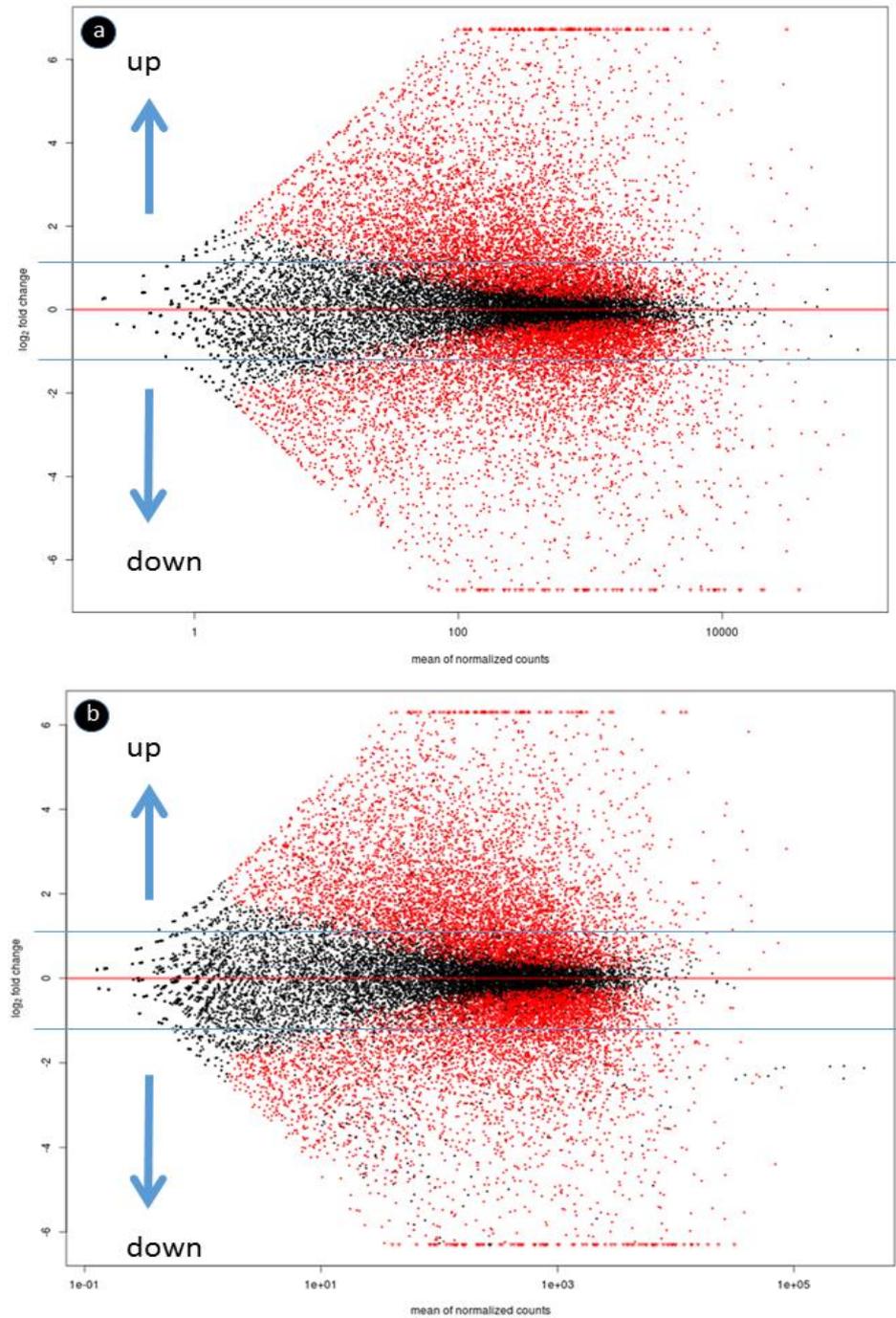


Figura 5.1 - Correlação pelo método MA-plot confrontando os dados de  $\log_2\text{FoldChange}$  e a contagem dos reads normalizados para cada gene diferencialmente expresso. Em a. Plantas inoculadas com FMA sob déficit hídrico x controle micorrizado irrigado. Em b. Plantas não-inoculadas com FMA sob déficit hídrico x controle irrigado. Genes diferencialmente expressos com  $\text{FDR} < 0,05$  encontram-se plotados em vermelho. Somente valores maiores que 1 e menores que -1 devem ser considerados, já que o conjunto intermediário pode incorrer em falsos-positivos. Up: induzidos para o tratamento sob estresse. Down: reprimidos para o tratamento sob estresse.

Tabela 5.2 – Os 50 genes diferencialmente expressos com maior valor padj (teste Benjamin-Hochberg) utilizando FDR<0,05, para o *Perfil 1* (Myc+Seca / Myc+Ctrl). Identificador das sequências na base de dados do Phytozome. Valores de expressão, indução (+) e repressão (-) em relação às plantas inoculadas com FMA sob seca. Padj (valor p ajustado a FDR < 0,05). Anotação funcional em relação as bases de dados NCBI, Phytozome e Pfam (1e-10). Classificação funcional relativa à base de dados do Gene Ontology.

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	Classificação Funcional
Phvul.002G033300	-6,630696425	0	NAD DEPENDENT EPIMERASE/DEHYDRATASE	Metabolismo de galactose
Phvul.009G162900	8,245802418	0	RAG1-ACTIVATING PROTEIN 1	Metabolismo de DNA
Phvul.011G059000	-7,919780611	2,79E-275	-	-
Phvul.010G015400	6,626735045	2,86E-237	Glutamate 5-kinase	Biossíntese de prolina
Phvul.008G041100	-5,726355718	4,44E-206	aquaporin NIP	Transporte de solutos
Phvul.010G063600	-5,247816563	8,02E-201	NUCLEOPORIN-RELATED	Transporte de solutos
Phvul.001G141500	4,788915021	2,77E-188	-	-
Phvul.005G174800	8,702778225	9,17E-187	LEA PROTEIN, PUTATIVE	Resposta a estresse abiótico
Phvul.003G236500	-3,884310309	2,89E-181	Peroxidase	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.004G051100	4,65478137	7,41E-176	-	-
Phvul.010G066800	-7,648981998	4,30E-162	Peroxidase	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.009G252900	-8,275987594	4,42E-158	Pathogenesis-related protein Bet v I family	Resposta a estresse biótico
Phvul.003G117200	4,984584699	3,34E-153	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor	Resposta a estresse biótico
Phvul.004G098300	-6,734862685	2,92E-150	Extensin-like region	Formação da parede celular
Phvul.002G144600	-4,390977852	3,18E-144	L-THREONINE 3-DEHYDROGENASE	Formação da parede celular
Phvul.002G027900	10,05356555	1,84E-143	Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300	Regulação pós-transcricional
Phvul.001G040000	-6,241127155	2,88E-140	LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE	Proteína quinase
Phvul.005G150200	-7,37928396	8,75E-140	Catalase	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.001G142000	9,039557379	6,03E-139	Late embryogenesis abundant (LEA) group 1	Resposta a estresse abiótico
Phvul.010G066900	-4,844631958	3,59E-137	Peroxidase	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.006G050400	3,380858442	1,38E-136	GLYCEROPHOSPHORYL DIESTER PHOSPHODIESTERASE	Metabolismo de lipídio
Phvul.001G267000	2,432320282	2,68E-135	UDP-glucuronate 4-epimerase.	Metabolismo de carboidrato
Phvul.009G239000	-3,490110259	5,57E-134	Proton-exporting ATPase	Transporte iônico
Phvul.010G135800	-4,677040296	4,62E-131	Linoleate 13S-lipoxygenase	Metabolismo de lipídios
Phvul.003G042000	3,143471715	4,71E-128	Protein of unknown function (DUF1675)	-
Phvul.006G129400	-6,391439186	6,68E-128	Peroxidase	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.007G069800	8,882872762	3,64E-127	-	-
Phvul.007G146300	-2,629976926	1,54E-126	UDP-glucuronate decarboxylase	Metabolismo de carboidrato

**continua**

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	conclusão
				Classificação Funcional
Phvul.003G149000	-4,559410229	5,94E-118	B-box zinc finger // CCT motif	Interação proteína-proteína
Phvul.005G143200	3,492316992	8,83E-118	26S proteasome regulatory complex, subunit PSMD10	Degradação de proteínas
Phvul.006G109800	4,191889048	1,19E-115	Glucose-6-phosphate 1-epimerase	Metabolismo de carboidrato
Phvul.001G054500	-7,950803778	1,65E-115	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER (PDR)	Atividade ATPase
Phvul.008G219700	3,678052035	1,65E-115	-	-
Phvul.011G083500	-8,751791828	4,35E-115	TRANSPORTER-RELATED	Transporte transmembranar
Phvul.006G205700	-3,954833176	2,93E-113	UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE	Atividade transferase
Phvul.006G055200	2,993858608	3,81E-111	Serine O-acetyltransferase	serine O-acetyltransferase activity
Phvul.003G120500	-5,171147157	3,26E-110	ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER (PDR)	Atividade ATPase
Phvul.001G181100	-1,977876899	2,94E-108	AQUAPORIN TRANSPORTER	Transporte de H <sub>2</sub> O/soluto
Phvul.010G152300	-9,89297198	7,68E-108	OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE(II) OXYGENASE FAMILY PROTEIN	Resposta a estresse biótico
Phvul.001G040300	-4,487118203	2,53E-104	LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE // SUBFAMILY NOT NAMED	Proteína quinase
Phvul.002G026900	-5,473518705	4,56E-102	coniferyl-alcohol glucosyltransferase	Resposta a estresse biótico/abiótico
Phvul.010G108800	2,641678798	4,56E-102	GBF2 (G-BOX BINDING FACTOR 2), DNA BINDING / TRANSCRIPTION FACTOR	Fator de transcrição
Phvul.006G167700	2,70187619	2,31E-101	RSN1(YEAST)-RELATED PROBABLE MEMBRANE PROTEIN	Transporte de fosfato
Phvul.001G129900	3,349647243	6,17E-101	Flavonol 3-O-glucosyltransferase	Resposta a estresse abiótico
Phvul.009G203300	-5,639376707	2,07E-100	reversibly glycosylated polypeptide/UDP-arabinopyranose mutase	Biossíntese de celulose
Phvul.009G133500	-6,068327707	1,90E-099	-	-
Phvul.005G094300	-3,230302168	9,98E-098	LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE	Proteína quinase
Phvul.007G248400	-7,426372156	1,84E-097	OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE(II) OXYGENASE FAMILY PROTEIN	Resposta a estresse biótico
Phvul.006G116000	8,232605167	2,28E-097	homeobox-leucine zipper protein	Fator de transcrição
Phvul.002G033300	-6,630696425	0	NAD DEPENDENT EPIMERASE/DEHYDRATASE	Metabolismo de galactose

Tabela 5.3 – Os 50 genes diferencialmente expressos com maior valor padj (teste Benjamin-Hochberg) utilizando FDR<0,05, para o *Perfil 2* (Myc-Seca / Myc-Ctrl). Identificador das sequências na base de dados do Phytozome. Valores de expressão, indução (+) e repressão (-) em relação às plantas não-inoculadas com FMA sob seca. Padj (valor p ajustado a FDR < 0,05). Anotação funcional em relação as bases de dados do Phytozome e Pfam (1e-10). Classificação funcional relativa à base de dados do Gene Ontology.

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	Classificação Funcional
PhvuI.001G143100	9,584016246	5,46E-210	Late embryogenesis abundant (LEA) group 1	Resposta a estresse biótico
PhvuI.001G075400	5,961490277	3,01E-187	PROTEIN PHOSPHATASE 2C	Transdução de sinais
PhvuI.002G314000	-4,836998394	1,11E-183	Coniferyl-aldehyde dehydrogenase	Resposta a estresse biótico/abiótico
PhvuI.006G129400	-6,393785851	5,05E-173	Peroxidase	Resposta a estresse oxidativo
PhvuI.003G020200	3,682681196	1,56E-167	OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE(II)	Resposta a estresse biótico
PhvuI.009G019400	5,803684951	3,53E-165	Thioredoxin, nucleoredoxin and related proteins	Resposta a estresse oxidativo
PhvuI.001G141500	5,473283941	2,08E-156	-	-
PhvuI.003G020300	3,670581629	6,00E-156	OXIDOREDUCTASE, 2OG-FE(II)	Resposta a estresse biótico
PhvuI.006G188900	5,99457785	8,00E-141	No apical meristem (NAM) protein	Fator de transcrição
PhvuI.008G035700	2,885452005	4,11E-139	-	-
PhvuI.001G019500	5,12090039	4,42E-133	SERINE CARBOXYPEPTIDASE II (CARBOXYPEPTIDASE D) (PLANTS)	Atividade de protease
PhvuI.003G096700	5,694722231	5,41E-132	Late embryogenesis abundant protein	Resposta a estresse abiótico
PhvuI.008G186200	7,992705618	4,19E-129	-	-
PhvuI.002G332200	3,234861066	1,64E-127	ANNEXIN	Resposta a estresse abiótico
PhvuI.011G047200	-3,178146762	5,31E-124	1,4-benzoquinone reductase-like; Trp repressor binding protein-like/protoplast-secreted protein	Regulação da transcrição
PhvuI.003G209000	8,29313758	1,36E-116	-	-
PhvuI.009G147500	2,47983711	1,15E-114	Alcohol dehydrogenase transcription factor Myb/SANT-like	Fator de transcrição
PhvuI.008G041100	-6,119935881	1,79E-112	aquaporin NIP	Transporte de solutos
PhvuI.001G142000	9,10976604	2,91E-108	Late embryogenesis abundant (LEA) group 1	Resposta a estresse abiótico
PhvuI.010G015400	8,686663612	1,51E-104	Glutamate 5-kinase	Biossíntese de prolina
PhvuI.008G231200	3,565702072	1,39E-103	protein phosphatase 2C	Transdução de sinais
PhvuI.010G073500	5,132458166	1,81E-103	MFS transporter, UMF1 family	Transporte de solutos/íons
PhvuI.009G100900	3,361269035	1,31E-102	Proton-exporting ATPase	Atividade ATPase
PhvuI.009G131000	9,046272683	4,42E-102	Naringenin-chalcone synthase	Resposta a estresse biótico
PhvuI.009G108200	2,672393271	7,14E-102	tocopherol cyclase	Resposta a estresse oxidativo
PhvuI.007G256500	3,983020751	2,92E-101	AMINO ACID TRANSPORTER	Transporte de amino ácidos

**continua**

				<b>conclusão</b>
<b>Phytozome ID</b>	<b>Log2foldchange</b>	<b>padj</b>	<b>Anotação Gênica Putativa</b>	<b>Classificação Funcional</b>
Phvul.011G049500	3,492856213	1,22E-097	Cold acclimation protein WCOR413	Resposta a estresse abiótico
Phvul.003G118900	3,288622093	5,55E-095	PROTEIN PHOSPHATASE 2C	protein serine/threonine phosphatase activity
Phvul.007G203400	3,547764125	1,30E-092	Inositol 3-alpha-galactosyltransferase	Biossíntese de raffinose
Phvul.005G042600	3,325725772	1,35E-092	Predicted sugar transporter	Transdução de sinais
Phvul.006G170200	-3,966389281	1,53E-092	heat shock 70kDa protein 1/8	Metabolismo de proteínas
Phvul.003G177800	7,217298309	3,28E-091	Oleosin	Metabolismo de lipídios
Phvul.002G181200	-9,061860593	4,57E-091	TYPE I INOSITOL POLYPHOSPHATE 5-PHOSPHATASE, ARATH	Transdução de sinais
Phvul.008G274300	-4,250916708	5,42E-091	GLYCEROPHOSPHORYL DIESTER PHOSPHODIESTERASE	Metabolismo de lipídios
Phvul.003G031300	10,17487864	1,53E-088	FAE1/Type III polyketide synthase-like protein	Metabolismo de lipídios
Phvul.009G028700	-1,810708576	2,31E-087	acetyl-CoA carboxylase / biotin carboxylase	Metabolismo de lipídios
Phvul.003G121900	10,56572187	4,05E-086	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT	Resposta a estresse abiótico
Phvul.005G051600	5,079366709	5,75E-086	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	Biossíntese de ABA
Phvul.005G025900	-6,837213196	6,49E-086	CHLOROPLAST NUCLEIOD DNA-BINDING-RELATED	Atividade protease
Phvul.007G016600	5,047485734	9,35E-086	Predicted mechanosensitive ion channel	Transporte transmembranar
Phvul.002G057300	4,716256784	1,78E-085	Auxin canalisation	Transporte de auxina
Phvul.005G174800	8,570533542	2,76E-085	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN	Resposta a estresse abiótico
Phvul.009G175800	2,64601788	1,17E-084	transitional endoplasmic reticulum ATPase	Formação do RE de transição
Phvul.006G116000	9,201437354	3,29E-084	homeobox-leucine zipper protein	Fator de transcrição
Phvul.002G026900	-5,321257373	4,57E-084	coniferyl-alcohol glucosyltransferase	Resposta a estresse biótico/abiótico
Phvul.003G194600	-3,908891324	2,20E-083	PQQ OXIDOREDUCTASE-RELATED	Metabolismo de carboidratos
Phvul.003G009200	-3,35975995	5,54E-083	Cytochrome P450 CYP2 subfamily	Metabolismo de lipídios
Phvul.009G244100	-4,874724977	1,03E-082	Cytochrome P450 CYP2 subfamily	Metabolismo de lipídios
Phvul.001G214400	3,376063331	2,60E-081	WRKY DNA -binding domain	Fator de transcrição
Phvul.006G186600	6,156002554	5,92E-081	ASPARAGINE SYNTHETASE	Resposta a estresse abiótico

Tabela 5.4 – Os genes diferencialmente expressos com maior valor padj (teste Benjamin-Hochberg) utilizando FDR<0,05, para o *Perfil 3* (Myc+Seca / Myc-Seca). Identificador das sequências na base de dados do Phytozome. Valores de expressão, indução (+) e repressão (-) em relação às plantas inoculadas com FMA sob seca. Padj (valor p ajustado a FDR < 0,05). Anotação funcional em relação as bases de dados do Phytozome e Pfam (1e-10). Classificação funcional relativa à base de dados do Gene Ontology.

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	Classificação Funcional
Phvul.001G132700	3,715836108	2,93E-073	Apoptotic ATPase	Morte celular
Phvul.004G077000	2,261434728	9,96E-073	GLUCAN 1,3-BETA-GLUCOSIDASE	Resposta a estímulo biótico
Phvul.008G027900	2,204565023	2,96E-072	SRF-type transcription factor / mads-box protein agl2 subfamily	Fator de transcrição
Phvul.001G020700	1,879199364	3,23E-072	hAT family dimerisation domain protein/ transposase	transposase
Phvul.008G198300	1,904129042	2,07E-071	Protease inhibitor/seed storage/LTP family	Resposta a estímulo biótico
Phvul.006G155700	-0,925536281	4,93E-070	alpha/beta hydrolase	Resposta a estresse abiótico
Phvul.004G138300	-1,527838117	7,45E-070	Trypsin and protease inhibitor	Inibidor endopeptidase
Phvul.005G025400	1,503420681	1,15E-069	rna-processing protein utp23 homolog	Regulação transcrição
Phvul.003G048000	1,475817675	1,74E-069	transcription factor bhlh95	Fator de transcrição
Phvul.007G194300	1,57054969	2,99E-069	Autophagy protein Apg9	Morte celular
Phvul.009G037900	1,578189122	6,91E-069	ZF-HD protein dimerisation region	Fator de transcrição
Phvul.010G018200	1,402205463	1,23E-068	bZIP transcription factor	Fator de Transcrição
Phvul.008G182000	1,379914718	2,88E-068	KIP1-like protein	Proteína quinase
Phvul.002G134900	1,36881891	4,34E-068	Predicted lipase/calmodulin-binding heat-shock protein	Metabolismo lipídio
Phvul.009G081800	1,184553572	5,71E-068	Cytokinin dehydrogenase 1	Resposta a estresse oxidativo
Phvul.008G162700	1,387507052	2,63E-066	VQ motif – uncharacterized protein	Resposta a estímulo biótico
Phvul.002G122600	1,369168941	3,67E-065	Glucose dehydrogenase	Resposta a estímulo biótico
Phvul.011G107200	1,267802061	4,58E-065	Terpene synthase family, metal binding domain	Sinalização celular
Phvul.008G230700	-0,66881359	3,00E-058	Regulator of chromosome condensation (RCC1) repeat	Regulação da transcrição
Phvul.001G051900	1,183108035	4,73E-058	K+/H+-antiporter	Transporte iônico
Phvul.011G019400	-1,090788808	1,79E-057	K+/H+-antiporter	Transporte iônico
Phvul.002G184200	1,1244227	2,18E-057	ZINC TRANSPORTER SLC39A7 (HISTIDINE-RICH MEMBRANE PROTEIN KE4)	Transporte transmembranar
Phvul.006G178800	-1,26998278	4,37E-054	RING FINGER DOMAIN-CONTAINING	Ligação a Zn <sup>+</sup>
Phvul.001G212000	1,171662184	5,32E-054	SF7 - SGT-1-RELATED	-
Phvul.002G067000	-0,765438379	6,74E-054	NITRATE TRANSPORTER (NTL1)	Absorção de nitrogênio
Phvul.009G084500	1,079401173	1,68E-053	FAE1/Type III polyketide synthase-like protein	Metabolismo de lipídios
Phvul.010G025000	1,22301123	2,76E-053	DISEASE RESISTANCE PROTEIN (TIR-NBS-LRR CLASS), PUTATIVE	Transdução de sinais
Phvul.001G028400	1,073500256	2,89E-053	exocyst complex component 7	Excitose

**continua**

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	continuação
				Classificação Funcional
Phvul.003G019700	0,775253823	2,91E-053	PROTEASE FAMILY S9B,C DIPEPTIDYL-PEPTIDASE IV-RELATED	Atividade protease
Phvul.003G208600	1,040431434	3,34E-053	DELLA protein	Repressor crescimento celular
Phvul.002G129100	-0,863734593	7,38E-053	PUTATIVE EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION STRESS PROTEIN (ERD3)	Resposta a estresse abiótico
Phvul.003G259000	1,12817494	8,69E-053	-	-
Phvul.005G119100	-0,816641384	7,43E-052	OS04G0686000 PROTEIN	Degradação proteica
Phvul.009G138300	1,027767228	8,06E-052	SF77 - CELL DIVISION PROTEIN KINASE	Fosforilação de fosfoproteínas
Phvul.002G067100	-0,890929736	6,46E-051	NITRATE TRANSPORTER (NTL1)	Absorção de nitrogênio
Phvul.010G005400	1,004060187	8,39E-051	PRONE (Plant-specific Rop nucleotide exchanger)	Resposta a estresse abiótico
Phvul.005G132700	0,930728315	1,68E-050	HOMEBOX PROTEIN TRANSCRIPTION FACTORS	Fator de transcrição
Phvul.002G063400	-1,033769726	2,37E-050	Domain of unknown function (DUF239)	-
Phvul.002G273800	1,011944639	2,33E-049	CCAAT-BINDING TRANSCRIPTION FACTOR SUBUNIT A	Fator de transcrição
Phvul.006G059300	1,067349731	3,19E-049	Kinesin (KAR3 subfamily)	Atividade motora
Phvul.004G073700	0,809565044	6,03E-049	Valine--tRNA ligase	Regulação de transcrição
Phvul.008G227200	-0,720131987	6,86E-049	EamA-like transporter family // Triose-phosphate Transporter family	Transporte de carboidrato
Phvul.008G096400	0,802979352	9,47E-049	Small hydrophilic plant seed protein	Resposta a estresse abiótico
Phvul.002G239000	-1,057060857	9,89E-049	-	-
Phvul.002G025400	-1,048942305	1,17E-048	PPR repeat	Regulação pós-transcricional
Phvul.004G166700	0,807448228	1,34E-048	-	-
Phvul.001G221700	-1,002136696	1,40E-048	HYDROPHOBIC PROTEIN RC12 (LOW TEMPERATURE AND SALT RESPONSIVE PROTEIN LTI6)-RELATED	Resposta a estresse abiótico
Phvul.011G005100	-1,035406414	2,17E-048	INVERTASE/PECTIN METHYLESTERASE INHIBITOR FAMILY PROTEIN	Resposta a estresse biótico
Phvul.001G000100	-0,005600659	3,51E-048	Chromo (CHRromatin Organisation MOdifier) domain	Regulação de transcrição
Phvul.001G000200	0,056763067	4,70E-048	-	-
Phvul.001G000300	-0,128165989	5,62E-048	-	-
Phvul.001G000400	-0,233373018	6,49E-048	light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 7	Metabolismo celular
Phvul.001G000500	-0,074575948	6,91E-048	CELL DIVISION PROTEIN KINASE	Fosforilação de fosfoproteínas
Phvul.001G000600	0,312325727	9,40E-048	DNA REPAIR DEAD HELICASE RAD3/XP-D SUBFAMILY MEMBER	Reparo DNA
Phvul.001G000700	-0,113842062	9,45E-048	3 BETA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE	Biossíntese de flavonóides
Phvul.001G000800	-0,007256131	1,03E-047	12-oxophytodienoate reductase	Biossíntese de ácido jasmônico
Phvul.001G000900	-0,130812694	1,74E-047	LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE	Fosforilação de fosfoproteínas
Phvul.001G001000	-0,129292456	2,13E-047	Catalase	Resposta a estresse oxidativo

**continua**

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Anotação Gênica Putativa	conclusão
				Classificação Funcional
Phvul.001G001100	0,276370275	2,18E-047	Predicted hormone receptor interactor	Percepção de sinais
Phvul.001G001200	-0,035558292	2,25E-047	PPR repeat	Regulação pós-transcricional
Phvul.001G001300	-0,188586055	4,61E-047	OPC-8:0 CoA ligase 1	Metabolismo de lipídios
Phvul.001G001400	-0,049887952	5,11E-047	SCYTHE/BAT3	Morte e proliferação celular
Phvul.001G001500	0,091722417	1,07E-024	PECTINESTERASE	Modificação da parede celular
Phvul.001G001600	0,067542923	1,00E-007	Predicted pseudouridylate synthase	Regulação de transcrição
Phvul.001G001700	0,013436412	3,32E-007	Prolyl oligopeptidase	Resposta a estresse abiótico
Phvul.001G001800	0,558609089	5,78E-006	-	-
Phvul.001G001900	0,130461545	1,97E-005	Alpha-amylase	Metabolismo de carboidratos
Phvul.001G002000	0,044024637	0,00425771	Glutathione transferase	Resposta ao estresse oxidativo
Phvul.001G002100	-0,192047341	0,00476169	THIOREDOXIN	Resposta ao estresse oxidativo
Phvul.001G002200	-0,076490708	0,00476169	-	-

Em virtude da significativa diferença encontrada entre os números de DEGs obtidos para P1 e P2 em relação à P3, além dos reduzidos valores de expressão gênica diferencial obtidos em P3, podemos inferir que a influência da inoculação sobre os perfis de expressão gênica da planta sobre estresse é muito mais um produto da modulação mais refinada de grupos de genes já regularmente regulados durante a resposta ao estresse do que da indução e/ou repressão de novos transcritos. Os heatmaps mostrados nas Figuras 5.1 e 5.2 ajudam a ilustrar esta observação.

Uma tênue diferença pode ser observada nos valores de expressão de todos os DEGs analisados, sendo que estas alterações nos perfis de indução e/ou repressão não seguem um padrão, ou seja, a inoculação com FMA em geral produz uma indução e/ou repressão ora mais intensa, ora menos intensa, dependendo do transcrito em questão. As únicas exceções são relativas a quatro transcritos exclusivamente detectados em P1 (Figura 5.1), dois induzidos, uma proteína hipotética (Phvul.011G121700) e *Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase* (Phvul.006G050400) (metabolismo de lipídios), e dois reprimidos, *UDP-Glucosyltransferase* (Phvul.006G205700) e *UDP-arabinopyranose mutase* (Phvul.009G203300) (biossíntese de celulose). Neste caso, a ausência dos valores de  $\log_2\text{FoldChange}$  para a condição Myc- não pode ser considerada nula já que somente os valores de expressão com  $p$  ajustado  $<0.05$  foram considerados na construção do Heatmap. As proteínas esterase e mutase já foram indicadas por (CERVANTES-GÁMEZ et al., 2015) como diferencialmente expressas sob indução de FMA.

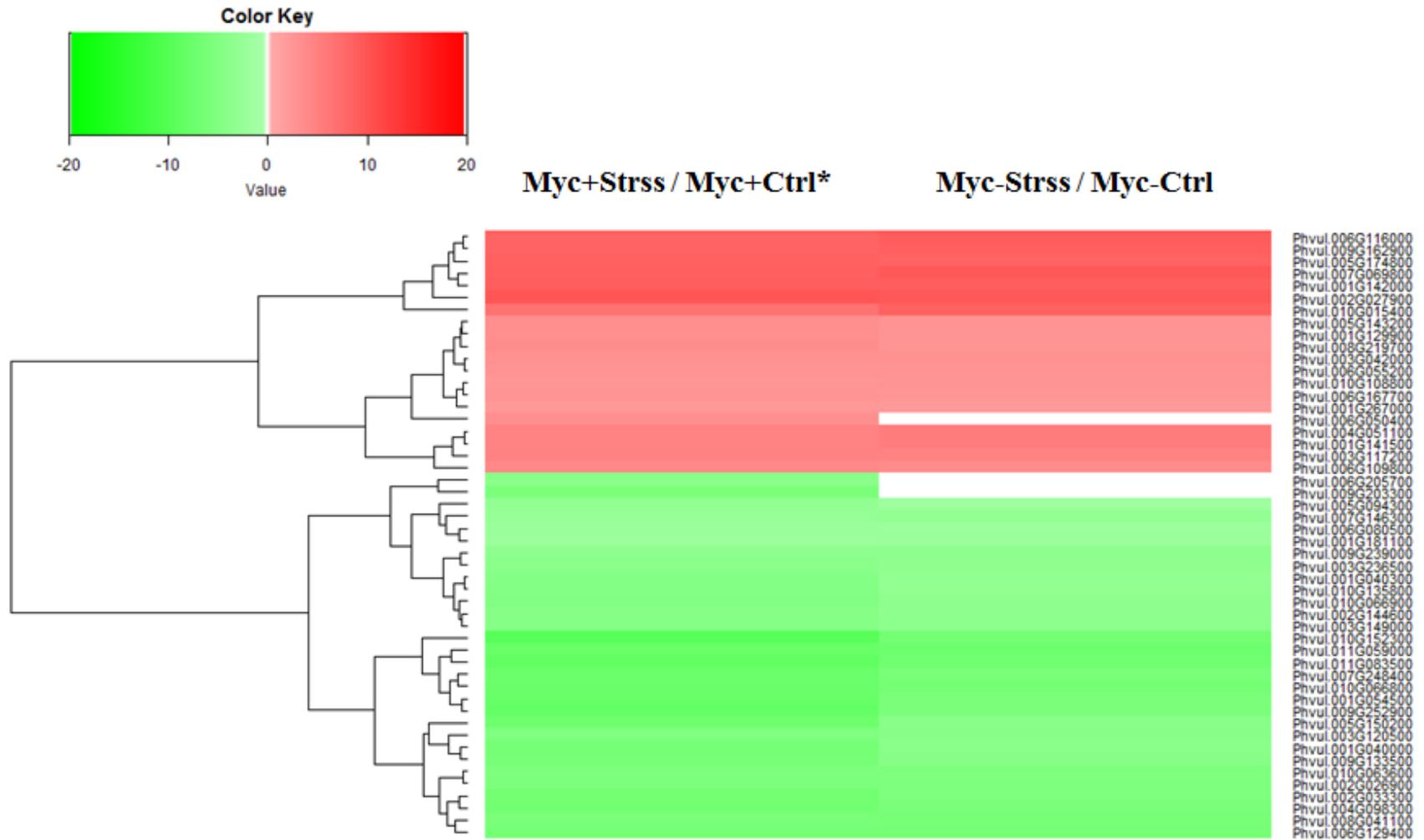


Figura 5.1 – Heatmap considerando os valores de expressão gênica diferencial ( $\log_2\text{FoldChange}$ ) dos 50 DEGs mais expressos em P1 e os valores obtidos para os mesmos transcritos em P2.

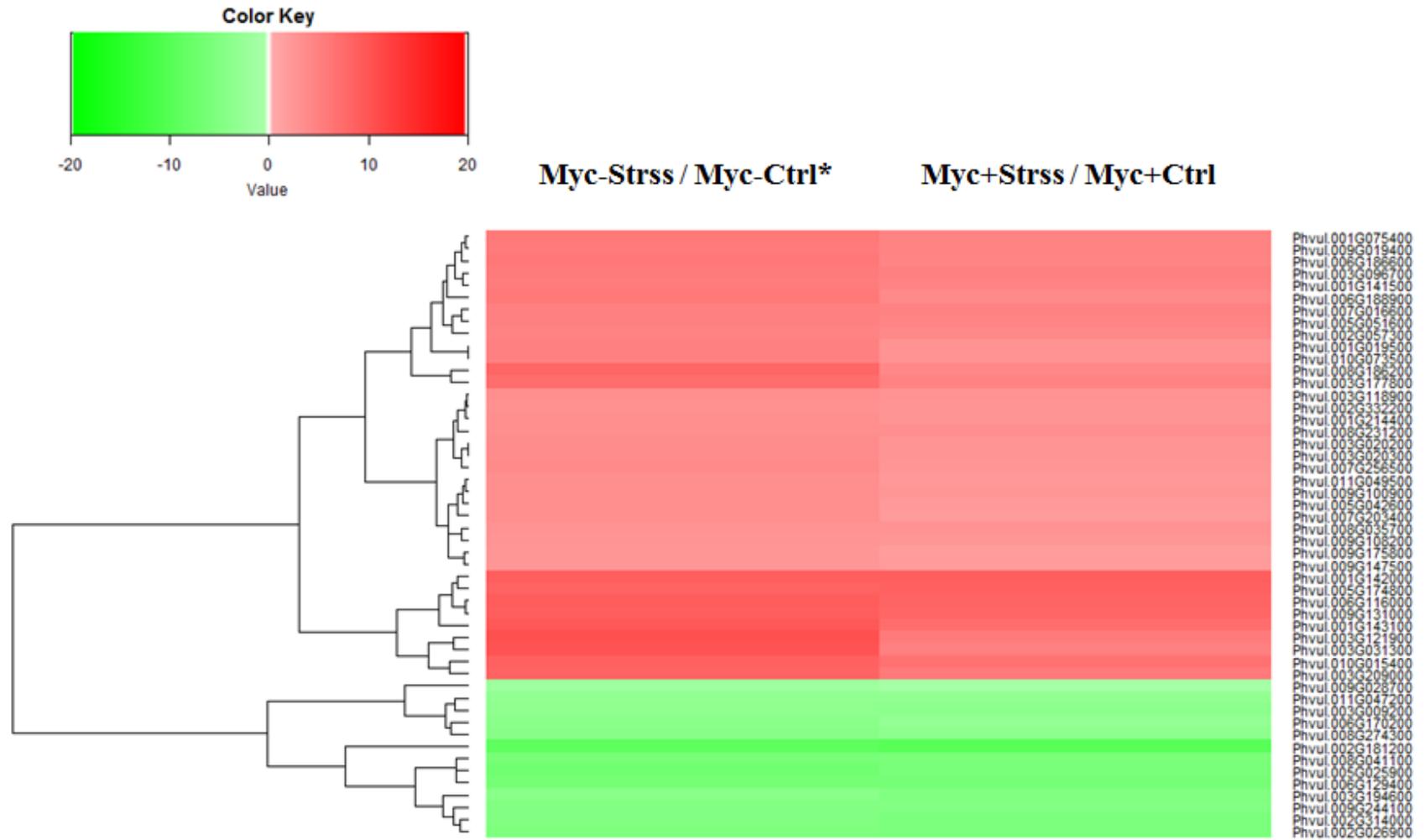


Figura 5.2 – Heatmap considerando os valores de expressão gênica diferencial ( $\log_2\text{FoldChange}$ ) dos 50 DEGs mais expressos em P2 e os valores obtidos para os mesmos transcritos em P1.

### 5.3.3 Classificação funcional das bibliotecas de RNA-Seq

O enriquecimento dos termos funcionais de *Gene Ontology* obtidos através do teste de *Fisher-2 tailed* ( $FDR < 0,01$ ) ajuda a compreender melhor as poucas diferenças guardadas entre os perfis P1 e P2 (Figura 5.3). A partir de um *cutoff* = 5, tomando-se a classe ontológica *Função Molecular*, variações significativas foram evidenciadas entre tratamentos controle e estresse, sendo que para as subclasses *atividade motora*, *percepção de sinais* e *reserva de nutrientes* não apresentaram transcritos nos tratamentos sob déficit hídrico. Em relação aos tratamentos de imposição de déficit hídrico, as subclasses que sofreram um maior aumento no número de unigenes representados sob efeito da inoculação com FMA foram *Fatores de Transcrição* (22 unigenes a mais, num total de 138), *Ligação ao DNA* (21 unigenes a mais, num total de 305) e *Ligação a lipídios* (10 unigenes a mais, num total de 39); a atividade *Ligação a nucleotídeo* foi a mais reprimida com 34 unigenes a mais (de um total de 620) para o tratamento Myc-/Seca. As subclasses *Regulação da transcrição* e *Canais iônicos* não apresentaram diferenças no número de unigenes representados para os tratamentos Myc+/Seca e Myc-/Seca.

Para os tratamentos controle (Ctrl), as subclasses *Regulação pós-transcricional* e *Carreador de elétrons* não apresentaram diferenças no número de genes. As maiores induções sob inoculação com FMA foram evidenciadas por: *Ligação a nucleotídeo* (46 unigenes, num total de 728), *Integridade estrutural* (18 unigenes, num total 121), *Peptidase* (16 unigenes, num total de 108), *Ligação a carboidratos* (13 unigenes, num total de 34) e *Nuclease* (12 unigenes, num total de 34). A maior repressão foi *Ligação ao DNA* (24 unigenes, num total de 237).

Comparando-se os tratamentos sob seca com seus respectivos controles, dentre os efeitos mais marcantes de ativação de mecanismos moleculares sob indução de FMA podemos destacar a subclasse *Fator de transcrição*, onde enquanto nos tratamentos Myc+ temos um aumento no número de unigenes amostrados quando sob déficit hídrico (10 a mais), no tratamento Myc- temos 16 unigenes a menos quando sob seca em relação ao respectivo controle. *Ligação a DNA* e *Ligação a lipídios* também apresentam um maior acúmulo de unigenes quando sob seca no tratamento Myc+, 45 e 12 respectivamente. As maiores repressões provocadas pela inoculação com FMA foram demonstradas para as classes *Ligação a nucleotídeo*, *Peptidase* e *Integridade estrutural* (80, 24 e 20 nucleotídios a menos comparando-se Myc+ estresse e controle).

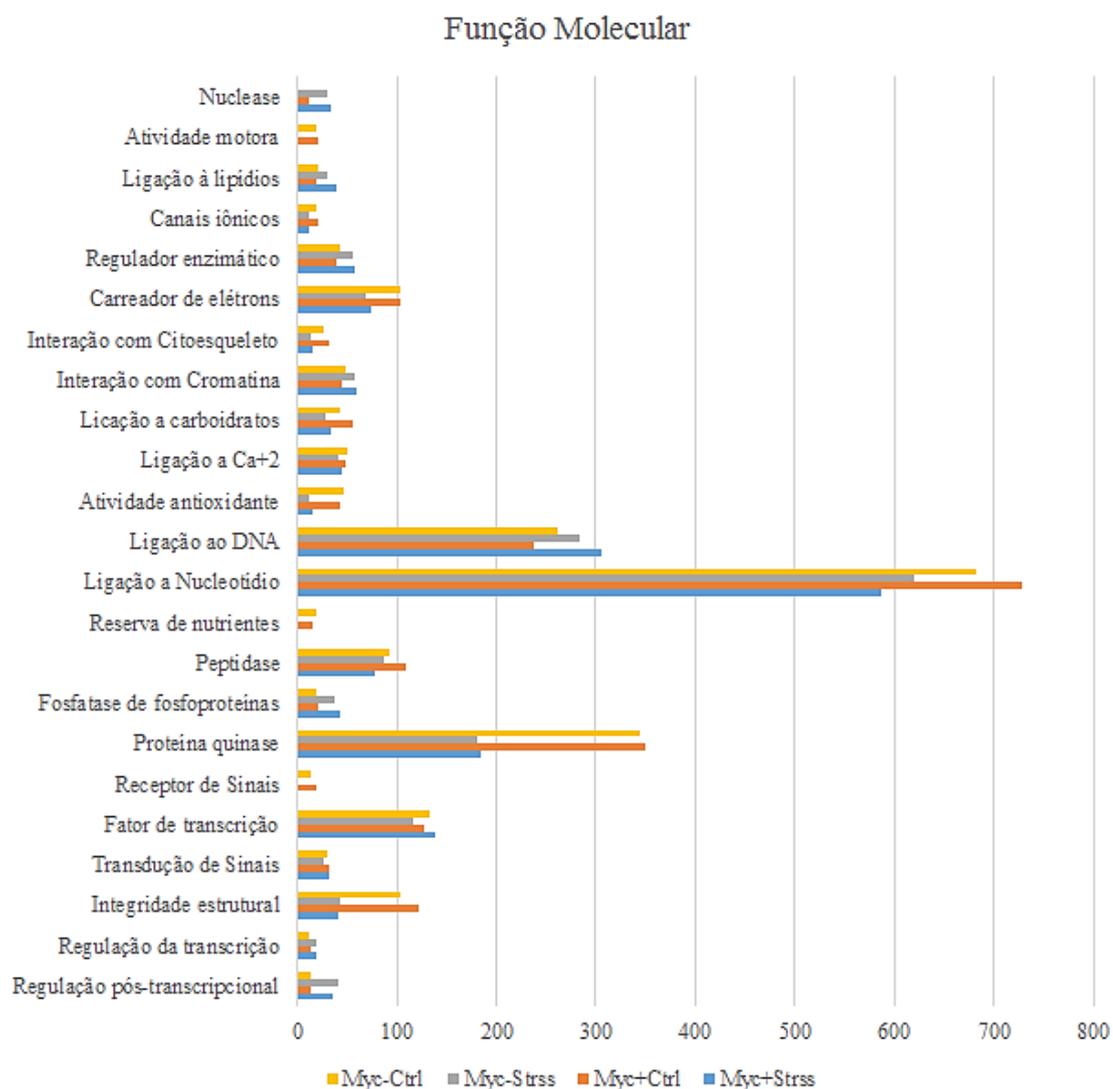


Figura 5.3 – Análise de enriquecimento dos termos funcionais associados a classe ontológica *Função Molecular* pelo teste de *Fisher-2 tailed* (FDR<0,01).

Em termos de *Processo Biológico*, a subclasse que apresentou um maior acúmulo de unigenes em ambos os tratamentos estresse e controle, quando sob inoculação com FMA, foi *Resposta a estímulos bióticos* com 72 unigenes a mais (num total de 124) no tratamento de seca e 95 no controle (num total de 119) (Figura 5.4). Comparando-se ambos os tratamentos de seca, a inoculação com FMA também aumentou o acúmulo de unigenes nas subclasses: *Respostas a estímulos endógenos* (24 unigenes, num total de 226) e *Transdução de sinais* (22 unigenes, num total de 200). Em relação aos controles, a maior indução foi *Tradução* (21 unigenes, num total de 129).

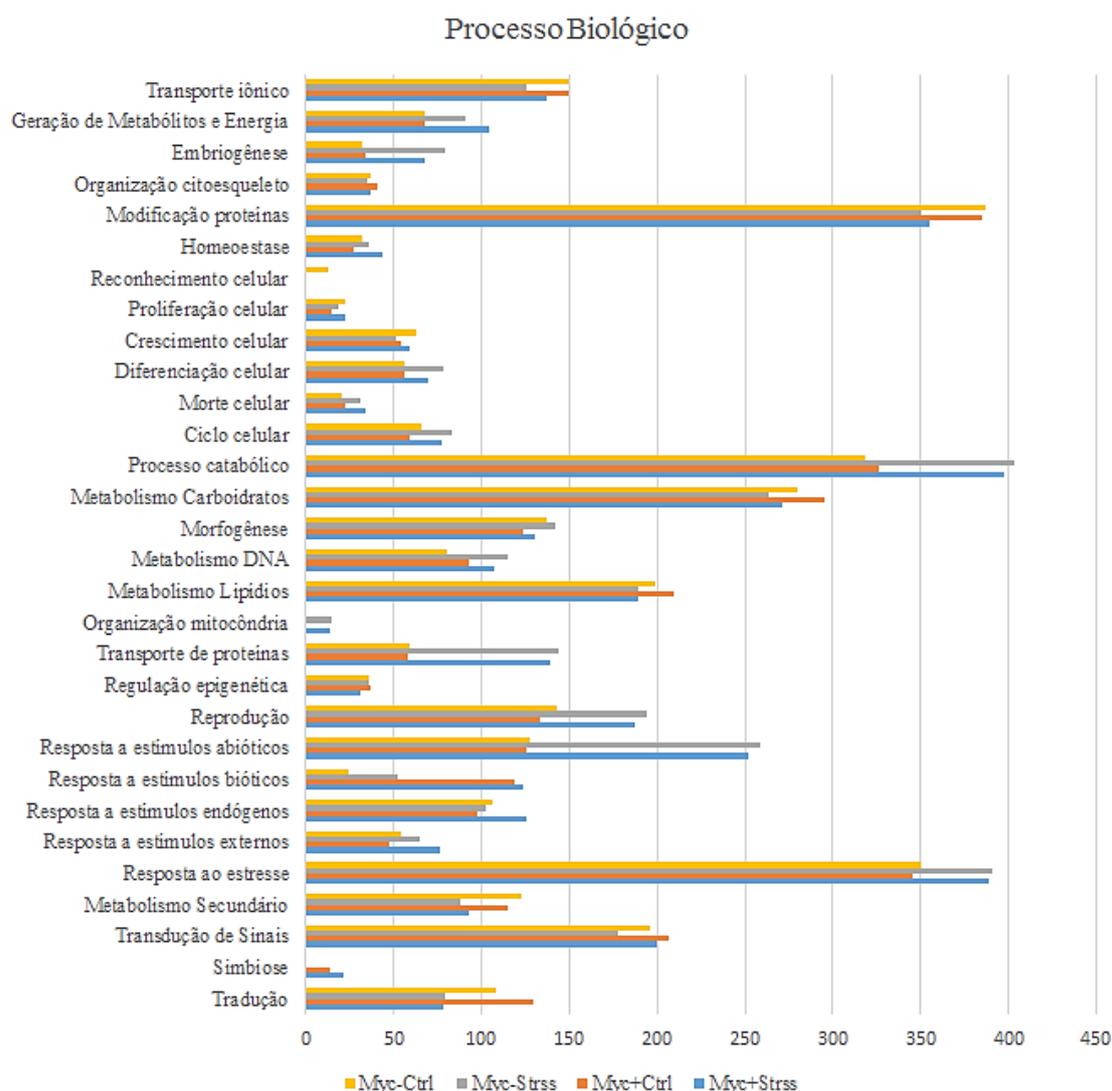


Figura 5.3 – Análise de enriquecimento dos termos funcionais associados a classe ontológica *Processo Biológico* pelo teste de *Fisher-2 tailed* (FDR<0,01).

A subclasse *Simbiose* somente apresentou unigenes para os tratamentos Myc+. Da mesma forma, *Organização mitocondria* somente apresentou unigenes para os tratamentos de Seca, algo esperado visto a importância dessas organelas na regulação de uma série de processos metabólicos associados à adaptação ao estresse, como o aumento na eliminação de excessos produzidos pela fotossíntese durante a restrição do Ciclo de Calvin, prevenindo uma redução excessiva das proteínas carreadoras de elétrons, o aumento na biossíntese de prolina (ormoprotetor) e de ascorbato, um poderoso antioxidante envolvido no combate a EROs (PASTORE et al., 2006). *Reconhecimento celular* apresentou 13 unigenes somente para o tratamento Myc-/Ctrl. Para ambos os tratamentos de seca não houve alteração no número de unigenes associados a *Metabolismo de lipídios* (189); como esta subclasse foi uma das mais

representadas dentre os DEGs obtidos para o perfil P3, podemos dizer que essa diferença guardada entre os tratamentos é mais quantitativa em nível de expressão gênica do que em número de unigenes representados. A *Regulação Epigenética* foi igual para ambos os tratamentos Myc-, e para Myc+ ela foi maior no controle.

A classe funcional que sofreu maior indução, comparando-se ambos os tratamentos de seca com seus respectivos controles, foi *Resposta a estímulos abióticos* com 132 unigenes a mais no tratamento Myc-/Seca e 126 no tratamento Myc+/Seca. Da mesma forma o *Metabolismo de DNA* e a *Embriogênese* (proteínas associadas ao controle osmótico tais como as proteínas LEA) foram mais induzidos na condição de seca para Myc-. Desta forma, fica evidente que as melhorias nas relações hídricas da planta advindas da inoculação com FMA, produzem um mecanismo adicional de tolerância a déficit hídrico, garantindo uma melhor adaptação e diminuindo a necessidade de ativação dos mecanismos bioquímicos e metabólicos de resposta em sua totalidade. Além disso, a inoculação com FMA desencadeou uma maior manutenção da homeostase celular durante o estresse, 17 unigenes a mais para Myc+ comparando Seca e Ctrl, e somente 4 unigenes a mais para Myc- comparando-se as mesmas condições. As subclasses *Respostas a estímulos externos*, *Respostas a estímulos endógenos* e *Geração de Metabólitos e Energia* foram também mais ativadas durante o estresse em Myc+.

Para o termo *Componente Celular*, comparando-se os tratamentos estresse e controle entre si, a subclasse *plastídio* foi a que apresentou maior diferença sendo que durante o estresse a inoculação com FMA produziu 37 unigenes a menos, e no controle 28 unigenes a mais, em relação à Myc-. A maior incidência de unigenes relacionados formação de plastídios no tratamento Myc+/ctrl já era aguardada (HAUSE; FESTER, 2004; LOHSE et al., 2005). No entanto, o número de unigenes associados a interação com componentes do núcleo celular, *Nucleoplasma* e *Cromossomo*, sofreram um aumento durante o estresse para Myc+, e uma repressão na condição controle. Comparando-se os tratamentos seca e controle para ambas as condições Myc+ e Myc- separadamente, o número de unigenes relacionados à formação de plastídios na ausência de FMA é bem maior (122), em relação ao tratamento inoculado (57). Este fato pode ser validado pelo elevado número de DEGs associados à interação com cromossomos e RNA (regulação pós-transcricional) descritos para P3 (Tabela 5.4). Não houve diferença na inoculação com FMA sobre os unigenes associados a formação do *Complexo de Golgi* e *Vesícula membranar* durante o estresse. Para o tratamento controle, a inoculação não afetou as subclasses *endossoma* e *Envelope nuclear*. A subclasse *envelope celular* não apresentou nenhum transcrito para o tratamento Myc+/Seca.

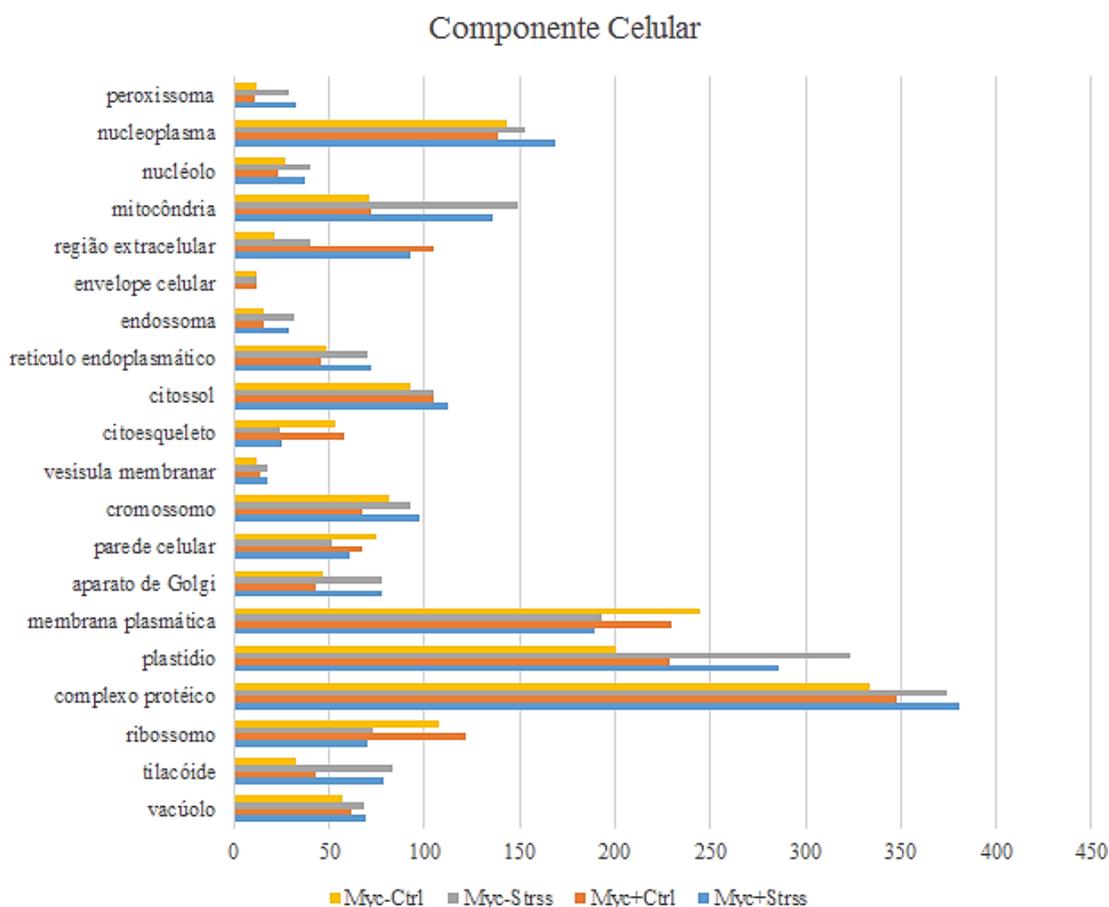


Figura 5.4 – Análise de enriquecimento dos termos funcionais associados a classe ontológica *Componente Celular* pelo teste de *Fisher-2 tailed* (FDR<0,01).

### 5.3.4 Genes regulados diferencialmente durante a interação de BAT 477 com FMA sob o efeito de déficit hídrico

Como relatado anteriormente (Tabela 5.4), as análises de expressão gênica diferencial comparando-se o número de reads alinhados a cada transcrito anotado de *P. vulgaris* obtidos para as condições Myc+/Seca e Myc-/Seca revelaram uma lista de 71 DEGs com valor *p* ajustado (*padj*) a FRD- (< 0,05). Destes 71 genes, 62 foram anotados podendo ser atribuídas funções putativas e classificação funcional. As classes funcionais mais representadas, ou seja, aquelas mais significativamente reguladas, entre induzidas ou reprimidas, sob efeito da inoculação com FMA durante seca foram *Resposta a estímulo biótico* e *Regulação da transcrição*, com dez e oito transcritos cada, seguidas por *Resposta a estímulo abiótico* e *Fator de transcrição* com seis cada e *Proteínas quinase* com 4.

Como a expansão das hifas irá ocorrer somente no córtex celular das raízes colonizadas, sugere-se que a planta hospedeira exerça algum tipo de controle sobre a proliferação do fungo (HAUSE et al., 2007). Estruturas típicas de defesa tais como papilas e aposição de calose na parede celular, além do aumento na biossíntese de compostos fenólicos e de lignina não são usualmente elicitados nas plantas durante a interação com FMA. No entanto, outros elementos tais quais a biossíntese de fenilpropanóides, ativação de enzimas de resposta ao estresse oxidativo e a indução de genes relacionados à patogenicidade (*PR – pathogenesis related*) que incluem enzimas hidrolíticas, já foram descritos em raízes colonizadas por FMA. Na maioria dos casos, tais sistemas de defesa são fracos, transientes, não coordenados, ou estritamente localizados e desta forma diferem daqueles das interações planta-patógeno (GIANINAZZI et al., 1996).

Dos DEGs associados à defesa e resposta à patogenicidade, seis foram induzidos pela presença de FMA: *Glucan 1,3 β-Glucosidase* (4,79 vezes), *Protease inhibitor* (3,74 vezes), *Glucose dehydrogenase* (2,58 vezes), *VQ motif uncharacterized protein* (2,61), *disease resistance protein* (2,33 vezes), *protease S9B,C* (1,71 vezes) e *pectinaesterase* (1,06 vezes). Outros três foram reprimidos: *ivertase/ pectin methylesterase inhibitor* (-2,04 vezes), *3-β-hydroxysteroid dehydrogenase* (-1,08 vezes) e *trypsin and protease inhibitor* (-2,88 vezes).

Apesar destes genes estarem provavelmente associados à interação do feijoeiro com as FMA, alguns deles podem também ter alguma influência na resposta ao déficit hídrico através de mecanismos de *crosstalk*. As proteínas Glucan 1,3 β-Glucosidase, os inibidores de proteases e Glucose dehydrogenase, são consideradas do mesmo grupo que as proteínas PR. Evidências apontam que as proteínas PR possam também desempenhar um papel importante no processo de tolerância a estresses abióticos em plantas, como demonstrado pelo seu elevado acúmulo em culturas sob estresse (GAUDET et al., 2000; KWON et al., 2007), incluindo em BAT 477 sob déficit hídrico (RECCHIA et al., 2013). Durante uma resposta típica a estresses ambientais, um mecanismo comum de defesa das plantas inclui a produção de peroxidases e compostos fenólicos, além do acúmulo de fitoalexinas e glicoproteínas ricas em prolina. Durante a análise de plantas de *Trifolium repens* sujeitas a um período de 14 dias de déficit hídrico foi observado o aumento significativo nas atividades enzimáticas de β-1,3 Glucanase e uma celulase (tal qual *Glucose dehydrogenase*) acompanhado do aumento na concentração de prolina das folhas (LEE et al., 2008). De fato, além de serem tipicamente induzidas por FMA em plantas (HAUSE; FESTER, 2004), β-1,3 Glucanases foram relatadas como importantes para a resposta a estresses salinos, excesso de água e indução por metil-

jasmonato e ABA (OPASSIRI et al., 2007) e choque osmótico (GREBOSZ; BADOWIEC; WEIDNER, 2014).

A regulação de inibidores de proteases em planta são uma importante estratégia de defesa contra a herbivoria e o ataque de patógenos (HABIB; FAZILI, 2007), e podem estar associados a um mecanismo de controle da colonização por FMA. Além disso, a regulação da atividade enzimática proteolítica das proteases, associadas ao dismantelamento e reciclagem de proteínas, é uma importante resposta a estresses abióticos. Enzimas peptidases sofreram forte indução de expressão em cultivares suscetíveis de *P. vulgaris* submetidos ao déficit hídrico, sendo que as mesmas enzimas sofreram repressão no cultivar tolerante com a progressão do estresse (HIENG et al., 2004).

A ação de enzimas pectinesterases, envolvidas diretamente no controle do nível de enrijecimento da parede celular como um mecanismo de defesa ao ataque de patógenos, podem estar também associadas a resposta ao déficit hídrico em plantas. Um gene *pectinaesterase* foi induzido em raízes de *Arabidopsis* expostas ao déficit hídrico e à infecção pelo nematoide *Heterodera shachtii* (ATKINSON; LILLEY; URWIN, 2013). O remodelamento da parede celular e membrana plasmática são essenciais para a correção de danos advindos do excesso da biossíntese de compostos com alto potencial oxidativo (EROs) gerados durante o déficit hídrico, mas também podem estar associados a remodelação da membrana plasmática para a acomodação dos arbúsculos durante a colonização por FMA. A indução do gene *Apg9* (2,97 vezes), relacionado à tradução da proteína Apg9 envolvida no endereçamento de compostos no citossol para a autofagia nos autofagossomas, deve estar associado à correção de danos advindos do estresse oxidativo, mas também ao consumo dos arbúsculos em senescência. Outros genes associados ao crescimento celular, *Della protein* (2,06 vezes), e a morte celular programada, *apoptotic ATPase* (13,14 vezes) e *sythe/BAT3* (-1,13 vezes) também foram alterados pela presença de FMA durante o déficit hídrico.

Plantas possuem um sofisticado mecanismo para o reconhecimento de sinais externos que as permitem responder de forma apropriada a variações ambientais. A percepção dos sinais é principalmente realizada pela estimulação de proteínas receptoras presentes na membrana plasmática. Um transcrito relacionado à tradução de uma proteína que interage com um receptor de sinal hormonal, *predicted hormone receptor interactor*, foi induzida 1,21 vezes sob inoculação com FMA. Após a percepção dos sinais, uma reação em cadeia de transdução de sinais direcionada para o núcleo celular é iniciada, sendo que essa sinalização é principalmente alcançada pela ativação enzimática através da fosforilação mediada principalmente pelas proteínas quinases. Um transcrito relacionado à proteína kinase,

*KIP-Like protein*, foi 2,60 vezes ativado sob inoculação com FMA, sendo que outros dois foram reprimidos, *cell division protein kinase* (-1,05 vezes) e *LRR-protein kinase* (-1,09 vezes).

O aumento na produção de compostos com alto potencial oxidativo tais como as EROS (radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o dióxigênio singlete ( $1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^-$ ) sob condições de estresses bióticos e abióticos são uma das principais formas de sinalização celular para o estresse, porém, estes compostos podem provocar uma série de danos à macromoléculas e estruturas celulares, conduzindo para a inibição do crescimento da planta e à morte celular (HOSSAIN et al., 2015). Dois genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo foram induzidos nos tratamentos com FMA, *Cytokinin dehydrogenase* (2,27 vezes) e *Glutathione transferase* (1,08 vezes), e dois genes foram reprimidos, *Catalase* (-1,09 vezes) e *Thioredoxin* (-1,14 vezes).

A variação exógena e endógena na concentração de determinados hormônios, dentre eles ABA, etileno, citocininas e jasmonatos, possuem também vital importância na sinalização para o estresse. Um gene associado a biossíntese de metil-jasmonato, *12-oxophytodienoate reductase*, foi 1,01 vezes reprimido sob interação com FMA. Segundo (HAUSE et al., 2007), embora raízes colonizadas por FMA frequentemente apresentem uma maior concentração de hormônios jasmonatos, a regulação da concentração intracelular destes hormônios conduzirá para uma variação nos níveis da micorrização, sendo quanto maior a concentração do hormônio, menor a micorrização. Embora a indução de *Terpene synthase* (2,40 vezes) possa estar associada a síntese de estrigolactonas, hormônio relacionado à sinalização para a indução de micorrização em plantas (AKIYAMA; MATSUZAKI; HAYASHI, 2005), o aumento na síntese de terpenóides durante o déficit hídrico já foi relatada (LLUSIÀ; PEÑUELAS, 1998). *Cytokinin dehydrogenase* também demonstrou um perfil de indução de expressão gênica. A super-expressão desta enzima em raízes de um mutante de tabaco sobre controle do promotor *WKY6* levou a queda nos níveis de citocina endógeno e aumento na tolerância à déficit hídrico e temperaturas elevadas (LUBOVSKÁ et al., 2014). A indução do gene *flavonoid 3-O glucosyltransferase* e do fator de transcrição *bhlh95* (2,78 vezes) podem estar indiretamente relacionadas ao acúmulo de antocianinas, um importante osmoregulador associado a tolerância à seca em plantas (CHALKER-SCOTT, 1999). Um ortólogo de *bhlh95* em *Arabidopsis* demonstrou, sob indução de ABA, um efeito negativo sob os níveis da síntese de jasmonato, e conseqüentemente um acúmulo de antocianinas na planta (NAKATA et al., 2013). Um fator de transcrição também caracterizado pelo domínio *Helix-loop-helix DNA-*

*binding* foi descrito como reprimido em raízes de *S. lycopersicum* colonizado por FMA (FIORILLI et al., 2009).

Além de *bhlh95*, outros cinco fatores de transcrição sofreram indução pela presença de FMA: *SRF-type transcription factor/ MADS box protein* (4,61 vezes), *bZIP* (2,64 vezes), *ZF-HD* (2,99 vezes), *homeobox domain* (1,91 vezes) e *CCAAT-binding transcription factor* (2,02 vezes). O papel desempenhado pelos fatores de transcrição bZIP na indução da tolerância à seca em raízes de feijoeiro já foi relatada (RODRIGUEZ-URIBE; O'CONNELL, 2006). *SRF-type transcription factor*, pertence à sub-família *mads-box protein agl2* e em plantas são descritos como envolvidos na transição do estado vegetativo para o reprodutivo através da repressão de genes envolvidos no desenvolvimento durante o estado vegetativo (KAUFMANN; MELZER; THEISSE, 2005). Nossa buscas por ortólogos de *ZF-HD* na base de dados do TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) revelaram que este transcrito tem forte homologia com proteínas do tipo ZPT2 que foram descritas em *Arabidopsis* como repressoras de outros fatores de transcrição e são fortemente induzidas durante a resposta à seca, frio, sal e ABA, além de seu aumento de expressão estar associado ao aumento na atividade de enzimas  $\beta$ - Glucuronidasas em folhas (SAKAMOTO et al., 2004).

A classe ontológica de *Regulação da transcrição gênica* foi uma das mais representadas entre os DEGs obtidos para P3. Três transcritos foram induzidos: *utp23* (2,83 vezes) que traduz para uma proteína envolvida no pré-processamento de rRNA; *predicted pseudouridylate synthase* (1,04 vezes) associada a síntese de pseudouridina, um composto envolvido na estabilização da fita de RNA durante sua síntese; e *valine-tRNA ligase* (1,75 vezes). Dos transcritos reprimidos temos: dois *PPR repeat motif uncharacterized proteins* (-2,06 e -1,02 vezes); *RCCI* (-1,59 vezes) uma proteína reguladora da condensação de cromossomos; e *Chromo domain* (-1,00 vez), um modificador da organização da cromatina.

Outro fator importante relacionado à expressão gênica foi o transcrito induzido pela presença de FMA, *hAT dimerization domain protein* (3,68 vezes), que condiciona para uma transposase da superfamília hAT (RUBIN; LITHWICK; LEVY, 2001). Um outro transcrito também associado a regulação da expressão gênica sofreu indução durante a interação com FMA, *VQ motif – uncharacterized protein*, uma proteína contendo o motivo VQ que pode se ligar a fatores *sigma-type* do tipo SigA associados ao reconhecimento de regiões promotoras específicas em plastídios (LERBS-MACHE, 2011). Além disso, proteínas que possuem o motivo VQ foram apontadas como capazes de interagir como uma série de fatores de transcrição WRKY, portanto, associadas a resposta de defesa a patogenicidade em plantas (WANG et al., 2015).

Dentre os transcritos diretamente associados à resposta da planta a estresses abióticos três deles sofreram indução: *PRONE (Rop nucleotide exchanger)* (2,00 vezes), uma proteína de ligação a GTP do tipo Rops, associada a sinalização para o estresse a a estabilização de estruturas do citoesqueleto envolvidas na manutenção da membrana plasmática (RIDLEY; HALL, 1992); *Prolyl oligopeptidase* (1,01 vezes); e *small hydrophilic plant seed protein* (1,74 vezes). Outros três transcritos foram reprimidos:  *$\alpha/\beta$  hydrolase* (-1,89 vezes); *ERD3 protein* (-1,82 vezes), uma proteína de resposta a desidratação; e *Hydrophobic protein RCI2* (-2,00 vezes), uma proteína LTI6 frequentemente associada a resposta a estresses salino e por frio.

## 5.5 Conclusões

Nossas análises indicam que as variações observadas nos perfis de expressão gênica de plantas inoculadas com FMA durante a ocorrência de déficit hídrico pode ser muito mais dependente da modulação da expressão de genes que já sofrem indução ou repressão durante a resposta ao estresse do que da expressão de novos transcritos. Ambos os conjuntos de genes obtidos, comparando-se os tratamentos sob déficit hídrico (inoculado ou não por FMA) e seus respectivos controles, revelaram dois perfis de expressão gênica bastante similares e, portanto, inteiramente voltados para a resposta do feijoeiro ao déficit hídrico, gerando uma base de dados bastante interessante que pode oferecer genes candidatos úteis para futuras iniciativas de melhoramento genético da cultura. Relacionando os perfis de expressão gênica de ambas as condições sob estresse usando os mesmos níveis rigorosos de significância, elaboramos uma lista contendo 71 genes como potencialmente induzidos/reprimidos na interação modelo feijoeiro-FMA durante a ocorrência de estresse. A anotação e classificação funcional destes genes demonstraram um menor enriquecimento sofrido pelo tratamento inoculado sob estresse para unigenes relacionados a resposta ao déficit hídrico. Desta forma, fica evidente que as melhorias nas relações hídricas da planta advindas da inoculação com FMA, produzem um mecanismo adicional de tolerância a déficit hídrico, garantindo uma melhor adaptação e diminuindo a necessidade de ativação dos mecanismos bioquímicos e metabólicos de resposta em sua totalidade. Além disso, a inoculação com FMA destacou um maior enriquecimento de unigenes relacionados à manutenção da homeostase celular sob déficit hídrico. Estes resultados oferecem uma importante contribuição para o campo das pesquisas envolvendo a influência de FMA sob o perfil de expressão gênica de plantas e apontam para a necessidade

do direcionamento do foco dos programas de melhoramento do feijoeiro para aspectos referentes às relações simbióticas desenvolvidas em âmbito radicular.

## Referências

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

AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? **New Phytologist**, Oxford, v. 173, n. 4, p. 808–816, 2006.

ARTHIKALA, M. K.; MONTIEL, J.; NAVA, N.; SANTANA, O.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, R.; CÁRDENAS, L.; QUINTO, C. PvRbohB negatively regulates *Rhizophagus irregularis* colonization in *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 54, n. 8, p. 1391–1402, 2013.

ATKINSON, N. J.; LILLEY, C. J.; URWIN, P. E. Identification of Genes Involved in the Response of *Arabidopsis* to Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 162, n. 4, p. 2028–2041, 2013.

BADOWIEC, A.; WEIDNER, S. Proteomic changes in the roots of germinating *Phaseolus vulgaris* seeds in response to chilling stress and post-stress recovery. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 6, p. 389–398, 2014.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, London, v. 1, n. 4, p. 48, 2010.

CERVANTES-GÁMEZ, R. G.; BUENO-IBARRA, M. A.; CRUZ-MENDÍVIL, A.; CALDERÓN-VÁZQUEZ, C. L.; RAMÍREZ-DOURIET, C. M.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; VILLALOBOS-LÓPEZ, M. Á.; VALDEZ-ORTÍZ, Á.; LÓPEZ-MEYER, M. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis-Induced Expression Changes in *Solanum lycopersicum* Leaves Revealed by RNA-seq Analysis. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, p. 1–14, 2015. doi:10.1007/s11105-015-0903-9.

CHALKER-SCOTT, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, Hoboken, v. 70, n. 1, p. 1–9, 1999.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

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

GAUDET, D. A.; LAROCHE, A.; FRICK, M.; DAVOREN, J.; PUCHALSKI, B.; ERGON, Å.; ERGON, A. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 1, p. 15–24, 2000.

GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, London, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GIANINAZZI, D. S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; DUMAS-GAUDOT, E.; GOLLOTTE, A.; ALAOU, A. T.; GIANINAZZI, S. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 133, n. 1, p. 45–57, 1996.

GRĘBOSZ, J.; BADOWIEC, A.; WEIDNER, S. Changes in the root proteome of Triticosecale grains germinating under osmotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 36, n. 4, p. 825–835, 2014.

HABIB, H.; FAZILI, K. M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Victoria Island, v. 2, n. 3, p. 68–85, 2007.

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

HIENG, B.; UGRINOVIĆ, K.; SUSTAR-VOZLIC, J.; KIDRIC, M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of Phaseolus vulgaris L. cultivars differing in sensitivity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, n. 5, p. 519–530, 2004.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S.-M.; QIAN, P.; XIN, W.; LI, H.-Y.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M.; TRAN, L.-S. P. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 1–19, 2015.

KAUFMANN, K.; MELZER, R.; THEISSE, G. MIKC-type MADS-domain proteins: Structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. **Gene**, Amsterdam, v. 347, special issue n. 2, p. 183–198, 2005.

KWON, Y.; KIM, S. H.; JUNG, M. S.; KIM, M. S.; OH, J. E.; JU, H. W.; KIM, K. I.; VIERLING, E.; LEE, H.; HONG, S. W. Arabidopsis hot2 encodes an endochitinase-like protein that is essential for tolerance to heat, salt and drought stresses. **Plant Journal**, Chichester, v. 49, n. 2, p. 184–193, 2007.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, London, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LEE, B. R.; JUNG, W. J.; LEE, B. H.; AVICE, J. C.; OURRY, A.; KIM, T. H. Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 132, n. 3, p. 329–337, 2008.

LERBS-MACHE, S. Function of plastid sigma factors in higher plants: Regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 76, n. 3-5, p. 235–249, 2011.

LLUSIÀ, J.; PEÑUELAS, J. Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 8, p. 1366–1373, 1998.

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

LOVE, M.; ANDERS, S.; HUBER, W. Differential analysis of rna-seq data at the gene level using the `deseq2` package. San Francisco, 2015. 42 p. Disponível em: <[http://watson.nci.nih.gov/~sdavis/tutorials/IntroToR/DESeq2\\_parathyroid.pdf](http://watson.nci.nih.gov/~sdavis/tutorials/IntroToR/DESeq2_parathyroid.pdf)>. Acesso em: 08 out. 2015.

LUBOVSKÁ, Z.; DOBRÁ, J.; ŠTORCHOVÁ, H.; WILHELMOVÁ, N.; VANKOVÁ, R. Cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression modifies antioxidant defense against heat, drought and their combination in *Nicotiana tabacum* plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 17, p. 1625–1633, 2014.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 52, n. 12, p. 2017–2038, 2011.

MOHR, U.; LANGE, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; VÖGELI-LANGE, R. Plant defence genes are induced in the pathogenic interaction between bean roots and *Fusarium solani*, but not in the symbiotic interaction with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, Oxford, v. 138, n. 1, p. 589–598, 1998.

NAKATA, M.; MITSUDA, N.; HERDE, M.; KOO, A. J. K.; MORENO, J. E.; SUZUKI, K.; HOWE, G. A.; OHME-TAKAGI, M. A bHLH-type transcription factor, ABA-Inducible Bhlh-Type Transcription Factor/Ja-Associated MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 5, p. 1641–1656, 2013.

OPASSIRI, R.; POMTHONG, B.; AKIYAMA, T.; NAKPHAICHIT, M.; ONKOKSOONG, T.; KETUDAT CAIRNS, M.; KETUDAT CAIRNS, J. R. A stress-induced rice (*Oryza sativa* L.) beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain. **The Biochemical Journal**, London, v. 408, n. 2, p. 241–249, 2007.

PASTORE, D.; TRONO, D.; LAUS, M. N.; DI FONZO, N.; FLAGELLA, Z. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: A case study: durum wheat mitochondria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 195–210, 2006.

RECCHIA, G. H.; GREGORIO, D.; CALDAS, G.; LUIZA, A.; BERALDO, A. Transcriptional Analysis of Drought-Induced Genes in the Roots of a Tolerant Genotype of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 4, p. 7155–7179, 2013.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, Cambridge, v. 70, n. 3, p. 389–399, 1992.

RODRIGUEZ-URIBE, L.; O'CONNELL, M. A. A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1391–1398, 2006.

RUBIN, E.; LITHWICK, G.; LEVY, A. A. Structure and evolution of the hAT transposon superfamily. **Genetics**, Bethesda, v. 158, n. 3, p. 949–957, 2001.

SAKAMOTO, H.; MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; MESHI, T.; IWABUCHI, M. Arabidopsis Cys2 / His2-Type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 2734–2746, 2004.

SALVIOLI, A.; BONFANTE, P. Systems biology and “omics” tools: A cooperation for next-generation mycorrhizal studies. **Plant Science**, Shannon, v. 203–204, p. 107–114, 2013.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A.; CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; ABERNATHY, B.; BARRY, K.; BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVIATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D.L.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.B.; ROKHSAR, D.S.; JACKSON, S.A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, London, v. 46, n. 7, p. 707–13, 2014.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, n. 5, p. 511–515, 2010.

WANG, H.; HU, Y.; PAN, J.; YU, D. Arabidopsis VQ motif-containing proteins VQ12 and VQ29 negatively modulate basal defense against *Botrytis cinerea*. **Scientific Reports**, London, v. 5, art. 14185, 2015. doi:10.1038/srep14185.

WU, J.; WANG, L.; LI, L.; WANG, S. De Novo Assembly of the Common Bean Transcriptome Using Short Reads for the Discovery of Drought-Responsive Genes. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e109262, 2014.

YANG, Z. B.; ETICHA, D.; FÜHRS, H.; HEINTZ, D.; AYOUB, D.; VAN DORSSELAER, A.; SCHLINGMANN, B.; RAO, I. M.; BRAUN, H. P.; HORST, W. J. Proteomic and phosphoproteomic analysis of polyethylene glycol-induced osmotic stress in root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 18, p. 5569–5586, 2013.

ZADRAŽNIK, T.; HOLLUNG, K.; EGGE-JACOBSEN, W.; MEGLIČ, V.; ŠUŠTARVOZLIČ, J. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 78, p. 254–272, 2013.

## 6 ANÁLISE DOS PADRÕES CELULARES ESPECÍFICOS DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA À SECA NO MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO (BAT477) – FMA

### Resumo

Nos últimos anos, a tecnologia de microdissecção a laser (LCM) por microscopia tem se tornado uma importante ferramenta empregada nos estudos dos mecanismos pelos quais FMA modulam a expressão de grupos de genes específicos em plantas. O processo de colonização das raízes de plantas por FMA é um fenômeno dinâmico. Arbúsculos novos são gerados ao mesmo tempo que estruturas antigas são fagocitadas pela planta. Consequentemente, transcritomas globais podem mascarar o verdadeiro papel desempenhado por determinados genes durante a interação da planta com o fungo. Neste trabalho, 23 transcritos foram selecionados a partir dos resultados prévios obtidos em nosso trabalho pelas técnicas de RT-qPCR e RNA-Seq e seus perfis de expressão foram comparados em três tipos celulares distintos: células do córtex radicular de plantas inoculadas por FMA contendo arbúsculos, células da epiderme de plantas inoculadas por FMA não contendo arbúsculos e células do córtex radicular de plantas não-inoculadas por FMA. Foram utilizados para o experimento o genótipo de feijoeiro BAT 477 (tolerante) sob déficit hídrico de 96h. Dos 23 transcritos analisados dois deles, *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* e *PIP2,3*, foram detectados somente em células do córtex radicular contendo arbúsculos e *Cytokinin dehydrogenase* se mostrou um produto exclusivo do córtex em raízes de feijoeiro, sendo induzidas em células arbusculadas. Um processo de indução de expressão em células da epiderme de raízes inoculadas por eventos de sinalização pode estar também presente conforme demonstrado pelos perfis obtidos para três fatores de transcrição, *NAM28*, *NAC4* e *NAM4*, além de *LEA5*. Dois outros genes, *BHLH95* e *RCC1*, foram reprimidos em tecido colonizado por FMA e podem indicar mecanismos de regulação da expressão genica modulados pelo fungo durante a interação com as plantas no córtex radicular. Seis outros genes foram induzidos em células contendo arbúsculos, embora não sejam exclusivos desse tipo celular. Essa variedade de processos revela a complexidade de mecanismos associados ao processo de regulação da expressão genica em plantas durante a interação com FMA e revela importantes genes candidatos para futuros estudos envolvendo o controle que eles exercem sobre a resposta do feijoeiro ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Microscopia de dissecção a laser. Arbúsculo. Córtex radicular. RT-qPCR.

**Abstract**

In the last years, laser-capture microdissection (LCM) microscopy has become an important tool applied to the study of the mechanisms by which AMF regulate gene expression patterns on host plants. The colonization of roots by AMF is a dynamical process. New arbuscules are generated at the same time as more mature structures are phagocytosed by the plant. Thus, global transcriptomes may sometimes mask the real role played by some genes during the plant – fungal symbiosis. In this work, 23 transcripts were selected from previous studies employing RT-qPCR and RNA-Seq analysis and their gene expression profiles were compared in three types of sample tissues: root cortical cells from plants inoculated with AMF (containing arbuscules), root epidermal cells of AM plants not containing arbuscules, and root cortical cells from no-AM control plants. Roots of BAT 477 (drought tolerant) common bean plants exposed to a water deficit regime of 96 h were employed in this study. From the 23 transcripts analysed, *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* and *PIP2,3* were detected only on root cortical cells containing arbuscules and *Cytokinin dehydrogenase* was revealed to be an exclusive product from root cortical cells in common beans, being upregulated on arbusculated cells. An induction process of gene expression on epidermal cells may also be present as evidenced by the expression profiles of three transcription factors, *NAM28*, *NAC4* and *NAM4*, and *LEA5*. Two other genes, *BHLH95* and *RCC1*, were downregulated in AM arbusculated cells indicating additional mechanisms of gene expression regulation by the fungal partner. Six other genes were upregulated on root cortical arbusculated cells. This variety of processes reveal the complexity of mechanisms associated to gene expression regulation in plants during the interaction with AMF and also point to important candidate genes for future studies involving their control over common bean response to drought.

**Keywords:** Laser-capture microdissection microscopy. Arbuscule. Root cortex. RT-qPCR.

## 6. Introdução

A maioria das plantas estabelecem relações simbióticas com os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), que colonizam as células das raízes formando estruturas intracelulares denominadas arbúsculos. FMA formam uma extensa rede de hifas que alcançam regiões fora da zona de depleção da raiz sendo, portanto capazes de adquirir nutrientes e água a partir do solo de forma muito mais eficiente que o sistema radicular sozinho (SMITH; SMITH, 1990; RAPPARINI; PEÑUELAS, 2014). Sua antiga origem evolutiva (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000) e a ampla ocorrência da simbiose detectada em cerca de 80% das espécies de angiospermas sugerem que as plantas sustentam um sistema de programação genética singular envolvido na endossimbiose com FMA (PARNISKE, 2008; OLDROYD; HARRISON; PASZKOWSKI, 2014).

O desenvolvimento da micorrização é desencadeado por uma série de processos celulares que envolvem a expressão de genes específicos e provavelmente refletem a presença de sinais celulares autônomos, e também móveis, operando no córtex radicular (BALESTRINI; LANFRANCO, 2006). Muitos estudos recentes têm investigado as alterações dos perfis globais de expressão e tradução gênica em raízes micorrizadas e como estes podem estar associados as mudanças de vias metabólicas básicas relacionadas a aquisição de nutrientes pela planta. Entretanto, o desenvolvimento da simbiose não é um processo sincronizado, e após uma colonização inicial do córtex radicular, eventos secundários de infecção são iniciados e o processo de invasão é reiniciado (BALESTRINI et al., 2007). Além disso, o estabelecimento da colonização por FMA envolve uma profunda modificação estrutural em células do tecido radicular que envolvem a formação dos aparatos simplásticos que permitem a penetração das hifas e as alterações de parede celular e membrana plasmática de células corticais para a acomodação dos arbúsculos. Consequentemente, este fato levanta a questão de até que ponto o uso de órgãos completos não podem mascarar diferenças celulares específicas nos níveis de moléculas de RNA e proteínas amostrados (HOGEKAMP et al., 2011).

A tecnologia da microdissecção a laser (*Laser capture microdissection* – LCM) sob visualização em microscópios, oferece uma importante ferramenta para a solução desta questão (EMMERT-BUCK et al., 1996; GAUDE et al., 2012). LCM permite a obtenção precisa, sem contato e livre de contaminantes, de grupos celulares específicos, ou mesmo células únicas, isoladas a partir de cortes histológicos. Balestrini et al. (2007) foram os pioneiros no uso de LCM para as pesquisas envolvendo a interação plantas-FMA e foram capazes de identificar indução exclusiva em células do córtex radicular contendo arbúsculos, de dois transportadores trans-membranares de fósforo (*LePT3* e *LePT4*), e um também em células vizinhas não

colonizadas (*LePT5*) em plantas de *L. esculentum* colonizadas por *G. mossae*. Fiorilli et al. (2009) analisaram a expressão de 20 transcritos por RT-PCR no sistema *S. lycopersicum* – *G. mossae* e identificaram a indução exclusiva de cinco deles em células contendo arbúsculos, sendo que um gene associado a via de biossíntese de ABA foi exclusivamente expresso em células da planta controle não-micorrizadas. A expressão de genes exclusivamente em células contendo arbúsculos revelada através de LCM e RT-PCR foi também demonstrada por Gomez et al. (2009) e Guether et al. (2009). Hogemkamp et al. (2011) analisara por RT-qPCR um total de 62 transcritos tidos como significativamente diferencialmente expressos em um experimento de microarranjo envolvendo *M. truncatula* colonizada por *G. intraradices* e *G. mossae*, sendo 25 destes expressos somente em células contendo arbúsculos. Gaude et al. (2012) combinaram a técnica de microarranjo e LCM em *M. truncatula* e puderam traçar um perfil de transcrito de células contendo arbúsculos e vizinhas não arbusculadas, além de controle de plantas não-colonizadas.

Em nosso trabalho, 23 transcritos selecionados como regulados pela interação modelo feijoeiro – FMA (*Glomus clarom*, *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*) durante a ocorrência de déficit hídrico e tiveram seus perfis de expressão gênica analisados em grupos celulares específicos obtidos por meio de um sistema de LCM (Leica LMD7000 – Leica Microsystems®) por meio de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) e RT-qPCR (*Real-Time quantitative PCR*). Três grupos celulares foram abordados: Myc+ - células do córtex radicular (contendo arbúsculos), Myc- células da epiderme radicular (não-arbusculadas) e ctrl – células de córtex radicular de plantas (não-colonizadas).

## **6.2 Material e métodos**

### **6.2.1 Desenho experimental/ ensaio de déficit hídrico/ taxa de colonização por FMA**

As doze amostras de tecido radicular utilizadas na construção das bibliotecas de cDNA para o sequenciamento de RNA-Seq derivaram do mesmo ensaio em casa de vegetação descrito na Sessão 5.4.1. Análises referentes ao padrão de crescimento e parâmetros fisiológicos das plantas, bem como taxas de colonização por FMA, encontram-se disponíveis na Sessão 5.5.2 e no Anexo B.

### **6.2.2 Coleta e preparo das amostras para visualização por microscopia de campo claro**

Segmentos radiculares (1 cm) provenientes dos dois tratamentos de déficit hídrico de 96 h (plantas de BAT 477 inoculadas por FMA e não-inoculadas) foram coletados e fixados em

solução modificada de Karnovsky (1965) (glutaraldeído 2%, paraformaldéido 2%,  $\text{CaCl}_2$  0,001 M em solução 0,05 M de cacodilato de sódio pH 7,2) por 48 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (35% a 100%) e a infiltração foi conduzida de forma lenta em etanol. As amostras foram emblocadas em historesina (*HistoResin Mounting Media kit - Leica Heldeberg*) com endurecedor segundo recomendação do fabricante. Os cortes histológicos (5 µm de espessura) foram obtidos através do micrótomo RM 2155 (Leica®Germany) e contrastados com fucsina ácida 1% em água e azul de toluidina 0,05% (FEDER; O'BRIENN, 1968): as lâminas contendo os cortes foram mergulhadas em fucsina ácida 1% pré-aquecida a 40°C por 2 min, lavadas em água corrente, mergulhadas em azul de toluidina 0,05% por 5 min e novamente lavadas em água corrente. As lâminas foram cobertas com lamínula utilizando entelan. As mesmas foram analisadas ao microscópio Leica LMD 7000 (*Leica Microsystems®*) sendo as imagens digitalizadas com o auxílio do programa LAS.v.3.8 (<http://leica-application-suite.software.informer.com/3.8/>).

### **6.2.3 Coleta e preparo das amostras para análises de microdissecção a laser por microscopia no sistema Leica LMD (Leica Microsystems®)**

Segmentos radiculares (1 cm) provenientes dos dois tratamentos de déficit hídrico de 96 h (triplicatas biológicas, plantas de BAT 477 inoculadas por FMA e não-inoculadas) foram coletados e fixados em solução de paraformaldeído 10% (diluído em água milli-Q esterilizada a 0,01% DEPC), por um período de 24 h a 4° C. Estes segmentos foram então seccionados transversalmente e preparados para o processamento utilizando processador automático KD-TS6A (KEDEE Histopathology instruments) seguindo-se o protocolo proposto por Ludwig e Hochholdinger (2014). As amostras foram desidratadas em série etílica (70, 80, 90 e 100%), seguido de tratamento por etanol : xilol (3-4 h v/v): 75%:25%, 50%:50%, 25%:75%, 100% xilol a temperatura ambiente. A incorporação da parafina foi feita de forma lenta e gradual através de um gradiente começando com uma razão de 3:1 solução desidratação : parafina por 4 horas a 58° C. As amostras foram então transferidas para solução de desidratação:parafina (1:1) duas vezes (3 horas cada a 58° C) seguido da solução de parafina 100%. Os cortes histológicos (10 µm de espessura) foram obtidos através do micrótomo RM 2155 (Leica®Germany) e montados em lâminas do tipo PEN (*Leica Microsystems®*) sobre a membrana de polietileno-naftalato. As lâminas foram mantidas em *ultrafreezer* a -80° C (por no máximo 30 dias) e os estojos continham esferas de sílica gel para evitar acúmulo de umidade.

Antes da microdissecção a laser, as lâminas foram removidas do *ultrafreezer*  $-80^{\circ}\text{C}$  e descongeladas gradualmente: 20 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  e 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (em estojo contendo esferas de sílica gel). Desidratação (temperatura ambiente): 10 min mergulhadas em xilol 100%, seguido de série etflica 1 min etanol 100%, 30 s etanol 95%, 30 s etanol 70% e água DEPC 0,1% 1 min. Coloração: mergulhadas em fucsina ácida 1% pré-aquecida a  $40^{\circ}\text{C}$  por 2 min, lavadas em água DEPC 0,1%, mergulhadas em azul de toluidina 0,05% por 5 min e novamente lavadas em água DEPC 0,1%. Reidratação (temperatura ambiente): Etanol 95% 1 min e 30 s, etanol 100% 1 min e xilol 100% 10 min. As amostras foram deixadas expostas a temperatura da sala de microdissecção (em média  $18^{\circ}\text{C}$ ) para secagem, é aconselhável não deixar umidade sobre as lâminas.

A microdissecção a laser foi efetuada no microscópio Leica LMD 7000 (*Leica Microsystems*®). Cada sessão de ‘corte’ constava de no máximo duas lâminas (uma para cada tratamento), com duração de no máximo 4 h (temperatura da sala a  $18^{\circ}\text{C}$ ), variações nessas condições refletiram em queda na quantidade e qualidade das amostras de RNA total extraídas. Os cortes foram otimizados para a magnitude de 20 vezes, e as condições de laser: *Power: 60; abertura: 2; velocidade: 3; Specimen balance: 20; HeadCurrent: 100%; frequência do pulso: 4018; offset: 100*. Por diferenças nas qualidades das lâminas Inoculadas e controle, otimizamos a média de corte de 1 milhão de  $\mu\text{m}^2$  para cada população das lâminas de tecido inoculado e 500 mil  $\mu\text{m}^2$  para as lâminas de tecido não inoculado.

Três populações celulares foram seccionadas: Myc+ - células do córtex radicular (contendo arbúsculos – Inoculado com FMA sob déficit hídrico), Myc- células da epiderme radicular (não-arbusculadas - Inoculado com FMA sob déficit hídrico) e ctrl – células de córtex radicular de plantas (não-colonizadas – Não-Inoculado com FMA sob déficit hídrico).

O sistema LMD7000 trabalha com o sistema gravitacional de microdissecção, ou seja, as amostras caem da lâmina diretamente sobre a tampa do tubo (de 200  $\mu\text{l}$ ) onde serão coletadas. Dessa forma, 30  $\mu\text{l}$  de *Extraction Buffer* (*Arcturus*® *PicoPure*® *RNA Isolation kit* (*Applied Biosystems*™)) era colocado na superfície interna da tampa para estabilizar os cortes. O máximo de 4 h por experimento se deve a minimizar o ressecamento do tampão.

#### **6.2.4 Extração de RNA total das amostras microdissecadas**

A extração das amostras de RNA total foi feita utilizando-se o kit *Arcturus*® *PicoPure*® *RNA Isolation kit* (*Applied Biosystems*™). Imediatamente após a microdissecção a laser, os tubos eram fechados, um pulso rápido era feito em centrífuga para remover o tampão da tampa

e mais 20  $\mu$ l de *Extraction Buffer* eram adicionados à mistura. As amostras eram incubadas por 30 min a 42° C e centrifugadas a 800 g por 2 min. Em paralelo, o pré-condicionamento das colunas de purificação era feito: 250  $\mu$ l de *Conditioning buffer* eram pipetados diretamente no filtro, incubados por 5 min e centrifugados por 1 min a 16000 g. As amostras após a centrifugação eram misturadas a 50  $\mu$ l de etanol 70% lentamente com a pipeta e depositadas diretamente sobre o filtro da coluna de purificação já condicionada e centrifugadas por 2 min a 100 g seguido de mais 30 s de centrifugação a 16000 g. 100  $\mu$ l de *Wash Buffer1 (W1)* eram pipetados e centrifugados por 1 min a 8000 g, seguido de dois ciclos de 100  $\mu$ l cada de *Wash buffer2 (W2)* seguidos de centrifugação a 8000 g por 1 min cada. A coluna era transferida para um novo tubo estéril de 1 ml e 11  $\mu$ l de *Ellution Buffer* era pipetado direto no filtro, incubado a temperatura ambiente por 1 min e centrifugado por 1 min a 1000g, seguido de 16000 g por 1 min. A concentração e a qualidade das amostras foram estimadas nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, em Nanodrop 2000<sup>®</sup> e congeladas por no máximo 2 semanas em *ultrafreezer -80° C*.

As amostras de RNA foram tratadas com 1 unidade de DNase na presença de tampão da enzima. As amostras foram diluídas a 100 ng/ $\mu$ L. Para preparar a reação de RT-qPCR, 100 ng de cada amostra de RNA tratadas com DNase foram utilizados para sintetizar a primeira fita de cDNA (sscDNA). A síntese foi realizada utilizando o kit *Maxima<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit for two step RT-qPCR* (Fermentas<sup>TM</sup>) seguindo as instruções da fabricante.

### **6.2.5 Desenho de primers para as análises de RT-PCR e RT-qPCR**

O desenho dos primers para as análises de RT-PCR e RT-qPCR seguiram os mesmos parâmetros e procedimentos já descritos na sessão 5.5.5 (Tabela 6.1).

Tabela 6.1- Primers desenhados para RT-qPCR. Nome do primer, anotação gênica para o amplicon selecionado de acordo com bancos de dados de *P. vulgaris*, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento (°C), conteúdo de GC (%) e tamanho do amplicon (bp).

<b>Primer</b>	<b>Gene</b>	<b>Sequência</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>GC%</b>	<b>pb</b>
APP	<i>Apoptotic ATPase</i>	F:AGGATGTGCAAGGTCTGAGA R:GGCTCTCAAATCCATCCAACA	59,91 59,68	45 45	168
G1,3Glu	<i>Glucan 1,3βGlucosidase</i>	F:TTCAGGCTGCACTTGATTGG R:AAATCACAGGTCCCAGCAGA	58,75 58,9	50 50	163
SRF	<i>SRF-type (MADS- box)</i>	F:GGAGGGGAAGAGTGGAGTTG R:CTCATAAAGCTTGCCACGGT	59,38 58,55	60 50	164
PvNAC4	<i>PvNAC4</i>	F:AGCAGTTCAGGATGCCAGAT R:TGTCTCCGTCGTGAGTCTTG	59,83 60,02	50 55	198
hAT	<i>Tranposase hAT</i>	F:TGGATGTGAGCGAAATTGGAG R:CATCAAAGGGAAGAGCAACTGT	58,64 58,85	47,6 58,85	155
LTP	<i>Protease inhibitor</i>	F:CCAAATCCTTAGTGACGCCA R:TGACCCTGCCAACATCAAAG	57,89 58,38	50 50	186
HYD	<i>α/β hydrolase</i>	F:GCTGATGTATGTGAGCCCTTG R:ACTGGTGAAGCACTATCTGT	59,05 58,74	52,38 47,62	165
Utp23	<i>rRNA pré- processing</i>	F:ACAGTCGTTTTCGGTTTTAGGG R:CGCCGCCTTCGTATGTTTAG	60,16 59,93	55 50	180
bHLH95	<i>bHLH95</i>	F:GAAGCGAAATCATGGGGAGC R:GGAAGATGGGGAAGCAAAGC	59,3 59,18	55 55	162
PvNAM28	<i>NAM28</i>	F:GGTTTAGGTTCCACCCCACT R:CCCAAGGTTCCGCACTTGTAT	60,09 59,99	55 50	123
Apg9	<i>Autophagy protein 9</i>	F:CAATCACCGAACACCAGACA R:GGGCTGCAATAAACATCACCA	60,16 59,39	45 45	159
ZFHD	<i>Zinc fingerHD</i>	F:AGGAGATCGACGGGGAAATC R:TAAAAGGTGGTGGTGGTGGGA	59,84 60,04	55 50	124
bZIP	<i>bZIP TF</i>	F:TCCCCCTGTTCAAATCGCC R:AGGAGGGAAGTTGTGTAGCC	58,7 59	50 55	175
RCC1	<i>Regulation chrm condensation</i>	F:GTTTCCGCCGTGTTGTTACT R:GAGGGAAAGGCTCTGGAGTT	59,1 59	50 55	167
LPS	<i>lipase</i>	F:TGTCGGGGAGCAATGGAAAT R:CGATGACTCTGGGCAAGTTG	59,7 58,9	50 55	156
CKX	<i>Cytokinin dehydrogenase</i>	F:GGAGGGGCATTATGGGAAGA R:CGCCTTTGCCTGTTACAAC	58,85 59,05	55 50	193
GluD	<i>Glucose dehydrogenase</i>	F:AGGGTAGCTTCAGGTTTGGGA R:CACAGAGAGCAGAGAGGGATT	58,26 58,89	50 52,38	177
TRS	<i>Terpene synthase</i>	F:ACCACCGGATCACAGAAGAG R:ACCCTCTTCACTAGCACCAC	59,1 59,02	55 55	182
KAT	<i>K+/H+ antiporter</i>	F:AAAAGCAACAGCACGGACTC R:CAATGGGACCAAGTTCAGGA	59,34 57,42	50 50	172
NAM4	<i>NAM4</i>	F:AATGAAGGGTTCATTCGCAAC R:GAGCTGAGAGGCAACCAAAC	59,94 60	45 55	132
LEA5	<i>LEA5</i>	F:CTGTTTCATCGGCGAGGTTAT R:TCATGGGCCTGTAGTCACCT	60,1 60,53	50 55	183
PIP2,3	<i>PIP2,3</i>	F:CTTCCCATTGGATTTGCTGT R:CCGGGGCAAAGATACACTA	60,14 59,95	50 50	161
PIP2,5	<i>PIP2,5</i>	F:CGCAGAGATTATTGGCACCT R:ACAGGGATGGTGGCTAAGTG	60,24 60	50 55	149

### 6.2.6 Análise semi-quantitativa por RT-PCR

Os mesmos produtos obtidos a partir das sínteses de cDNA realizadas utilizando-se o kit *Maxima<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit for two step RT-qPCR* (Fermentas<sup>TM</sup>) para os três grupos celulares, foram submetidos a reações de PCR considerando-se cinco ciclos diferentes de amplificação: 30, 34, 38, 42 e 46 ciclos e todos os primers. As condições de amplificação foram as seguintes: 2,5 µl de PCR Buffer (10X); 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl de dNTP's (2,5 mM); 1 µl de Primer Forward (2,5 mM); 1 µl de Primer Reverse (2,5 mM), 1 µl de DNA (20ng/µl); 0,2 µl Taq Polymerase (50U/1 µl) e 15,3 µl de água DEPC 0,1%. As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min de desnaturação inicial a 94°C; 35 ciclos de: 30 seg de desnaturação a 94°C, 30 s de anelamento a 59°C, 15 s de extensão a 72°C; 7 min de extensão final a 72°C.

Após a reação a qualidade dos produtos de amplificação foi verificada em gel de agarose 1,2% em 1X TSB buffer, junto com padrão de 100 pb de DNA. As fotos dos géis no formato .TIFF foram submetidas ao programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/>) para os cálculos de densitometria de banda. Para cada primer foi indicado o melhor ciclo de amplificação possível para se comparar os perfis de amplificação para cada transcrito considerando-se as três populações celulares estudadas.

### 6.2.7 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram preparadas utilizando o *kit Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fementas<sup>TM</sup>), seguindo instruções do fabricante. As reações foram preparadas em volume final de 10 µL, contendo 0,25 µM de cada primer, 1 µL de cDNA e 5 µL de SYBR Green mix. A amplificação e leitura das amostras foi realizada no equipamento *StepOnePlus<sup>TM</sup> RealTime PCR Systems* (Applied Biosystems). Para cada amostra foram obtidas as curvas de amplificação e dissociação, para posterior análise. Cada amostra foi analisada em triplicata técnica. A amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s para desnaturação, 59°C por 20 s para anelamento dos primers e 72°C por 20 s para extensão dos fragmentos. Posteriormente foi realizada a construção da curva de *melting*: 95°C por 15 s, 60°C por 1 min com coleta de dados de fluorescência a cada 0,7° de variação (60°C a 95°C). Para cada placa de RT-qPCR analisada, foram incluídos dois genes de referência (IDE e skip16) como controle interno (BORGES et al., 2010).

Os valores de eficiência (E) e de Ct (*cycle threshold*) foram obtidos com o uso de do programa LinRegPCR (12.x) (RUIJTER et al., 2009). O programa REST<sup>®</sup>2009 (QUIAGEN<sup>®</sup>)

foi utilizado para obter os valores médios de  $N_0$  para cada uma das triplicatas e assim normalizar os resultados com base no valor de  $N_0$  dos genes de referência. Desta forma, foi possível gerar os valores de expressão gênica relativa para cada um dos transcritos analisados.

### 6.2.8 Controle endógeno

Para os três grupos celulares estudados, DNA total foi extraído utilizando-se o kit *QIAamp DNA Micro Kit* (QIAGEN®) seguindo-se as instruções do fabricante. PCR para confirmação da eficácia dos tratamentos: Uma reação de PCR foi realizada utilizando os primers AML1 e AML2 referentes ao gene da subunidade menor do rRNA que amplifica para todos os subgrupos de Glomeromycota e excluem sequências de outros organismos (LEE et al., 2008). As condições para amplificação incluíam: 2,5  $\mu$ l de PCR Buffer (10X); 1,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (50mM), 0,5  $\mu$ l de dNTP's (2,5 mM de cada); 1  $\mu$ l de Primer Forward (2,5 mM); 1  $\mu$ l de Primer Reverse (2,5 mM), 1  $\mu$ l de DNA (20 ng/ $\mu$ l); 0,2  $\mu$ l Taq Polymerase (50U/1  $\mu$ l) e 18,3  $\mu$ l de água. As condições de amplificação foram as seguintes: 15 min de desnaturação inicial a 94°C; 30 ciclos de: 30 s de desnaturação a 94°C, 40 s de anelamento a 58°C, 55 min de extensão a 72°C; 5 min de extensão final a 72°C. Após a reação a qualidade dos produtos de amplificação (presença de produtos de inespecíficos) foi verificada em gel de agarose 1,5% em 1X TSB buffer, junto com padrão de 100 pb de DNA.

## 6.3 Resultados e Discussão

### 6.3.1 Análise de microscopia em campo claro

As análises em microscopia de campo claro foram vitais para aprofundar nossos conhecimentos sobre como ocorre a interação com FMA em feijoeiro. Dado provavelmente o avançado estágio fenológico de desenvolvimento das plantas ( $R_5$ ), o processo de micorrização já sofreu vários ciclos de alternância e, portanto, poucos traços da presença de FMA foram encontrados em raízes primárias, sendo a maior abundância visualizada em lâminas de raízes provenientes de crescimento secundário. A observação de várias lâminas relativas ao mesmo segmento radicular indicaram que cortes muito finos (cortes de 5  $\mu$ m de espessura) podem acarretar no viés de se visualizar uma secção celular que não apresenta hifas visíveis, mas que outras camadas acabaram revelando a presença de um arbúsculo ou hifa (BALESTRINI et al., 2007). Dessa forma, mais repetições e cortes mais espessos (10  $\mu$ m) foram adotados nas análises de LCM por microscopia. Essas análises permitiram também a otimização do melhor protocolo disponível para o contraste dos tecidos vegetais e de FMA. As pranchas das Figuras

6.1 e 6.2 mostram os resultados obtidos para o tratamento Inoculado sob déficit hídrico de 96 h.

### **6.3.2 Microdissecção a laser por microscopia e extração de RNA-total**

Relativo às análises de microscopia (Figuras 6.3 e 6.4), embora o protocolo de coloração tenha se mostrado eficiente para as análises em historesina, para as amostras em parafina houve uma quase que total predominância do corante Azul de toluidina (0,05%), que, no entanto, não prejudicaram a identificação das estruturas de colonização por FMA.

No total, três populações celulares foram amostradas: Myc+ - consistindo de células do córtex radicular (contendo arbúsculos – Inoculado com FMA sob déficit hídrico), Myc- células da epiderme radicular (não-arbusculadas - Inoculado com FMA sob déficit hídrico) e ctrl – células de córtex radicular de plantas (não-colonizadas – Não-Inoculado com FMA sob déficit hídrico) (Figuras 6.3 e 6.4).

Diferenças nas qualidades das lâminas Inoculadas (Myc+ e Myc-) e não-inoculada (ctrl), nos levaram a otimizar os cortes para a média de 1 milhão de  $\mu\text{m}^2$  para cada população das lâminas de tecido inoculado e 500 mil  $\mu\text{m}^2$  para as lâminas de tecido não inoculado. A média de rendimento em termos de quantidade e qualidade de RNA total obtido durante as sessões de dissecção seguidas de extração foi de: Myc+: 15,14 ng/ $\mu\text{l}$  e qualidade de 1,85  $\lambda$ ; Myc-: 12,96 ng/ $\mu\text{l}$  e qualidade de 1,79  $\lambda$ ; ctrl: 13,6 ng/ $\mu\text{l}$  e qualidade de 1,83  $\lambda$ .

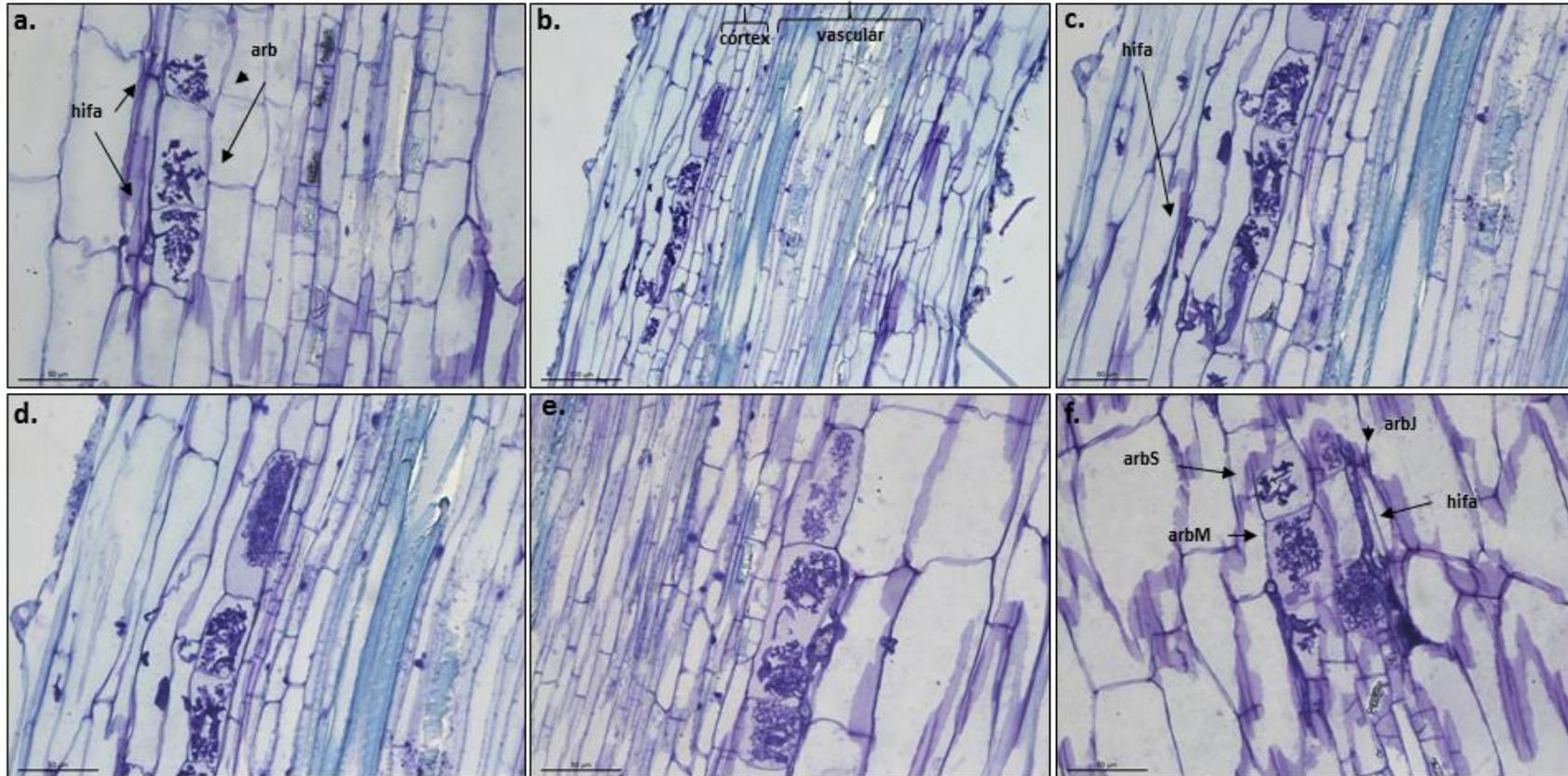


Figura 6.1 – Prancha 1 para as fotos de feijoeiro inoculadas com FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) obtidas através de microscopia de campo claro. a. Hifas crescendo por entre espaços intercelulares e a formação de arbúsculos (arb) (magnitude de 20x e 50  $\mu$ m). b. Disposição dos arbúsculos no córtex da raiz em relação ao tecido vascular (magnitude de 10x e 100  $\mu$ m). c. e d. ampliação da foto b. detalhando melhor hifas e arbúsculos (magnitude 20 vezes e 50  $\mu$ m). e. dois arbúsculos estabelecidos aparentemente na mesma célula hospedeira (magnitude 20x e 50  $\mu$ m). f. diferentes estágios de desenvolvimento de arbúsculos: arbúsculo jovem em estágio inicial de formação (arbJ), arbúsculo maduro (arbM) e arbúsculo senescente (arbS).

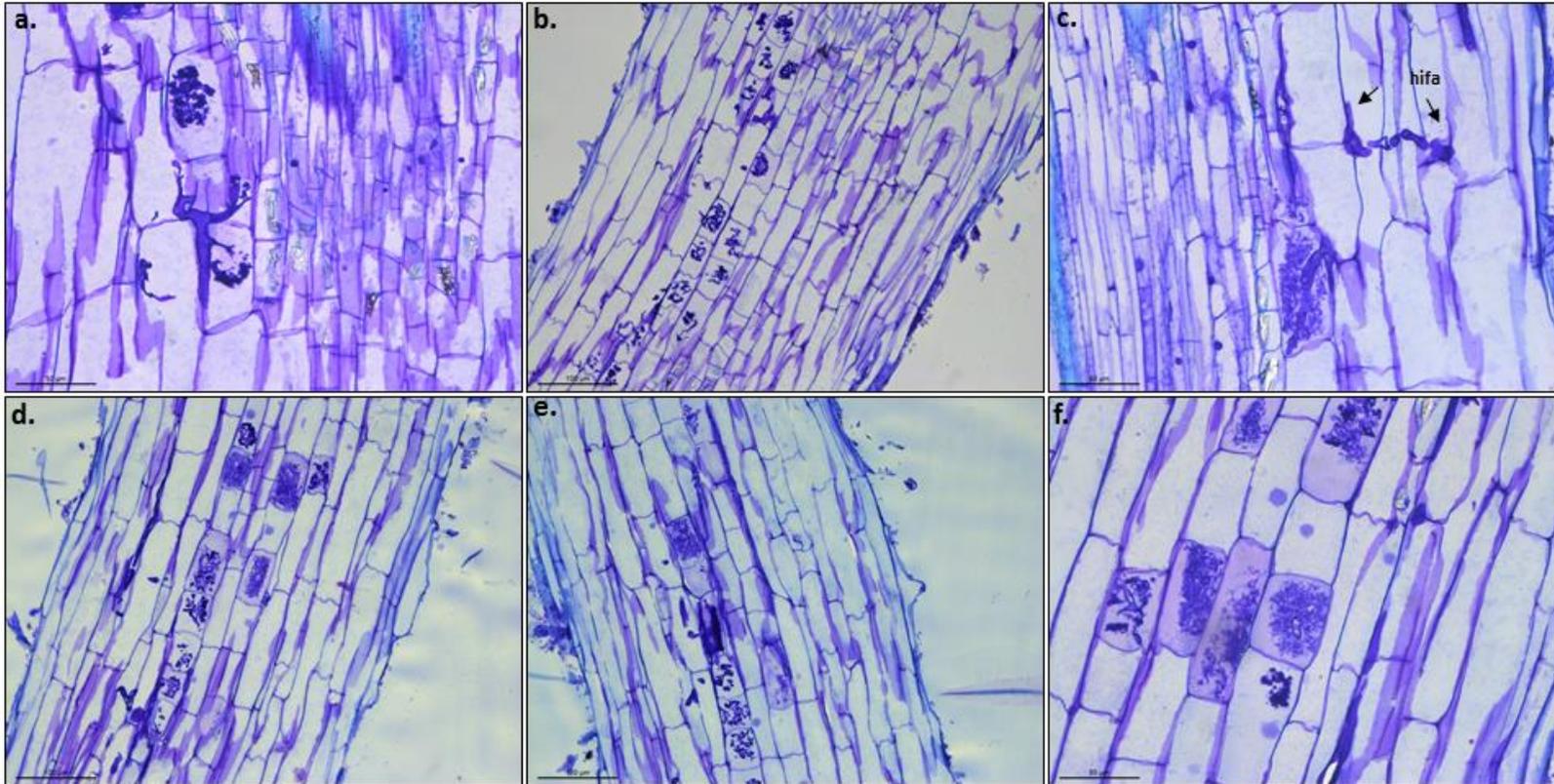


Figura 6.2 – Prancha 2 para as fotos de feijoeiro inoculadas com FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) obtidas através de microscopia de campo claro. a. Hifas crescendo por entre espaços intercelulares e a formação de arbúsculos (arb) (magnitude de 20x e 50  $\mu$ m). b. Disposição dos arbúsculos no córtex da raiz, por este ângulo não é possível a visualização de tecido vascular (magnitude de 10x e 100  $\mu$ m). c. destaque para a acomodação intercelular de hifas mais espessas (magnitude 20 vezes e 50  $\mu$ m). d. e e. rede de hifas e formação dos arbúsculos (magnitude 10x e 100  $\mu$ m). f. algumas células arbusculadas revelaram uma alteração na coloração (magnitude 20 vezes e 50  $\mu$ m).

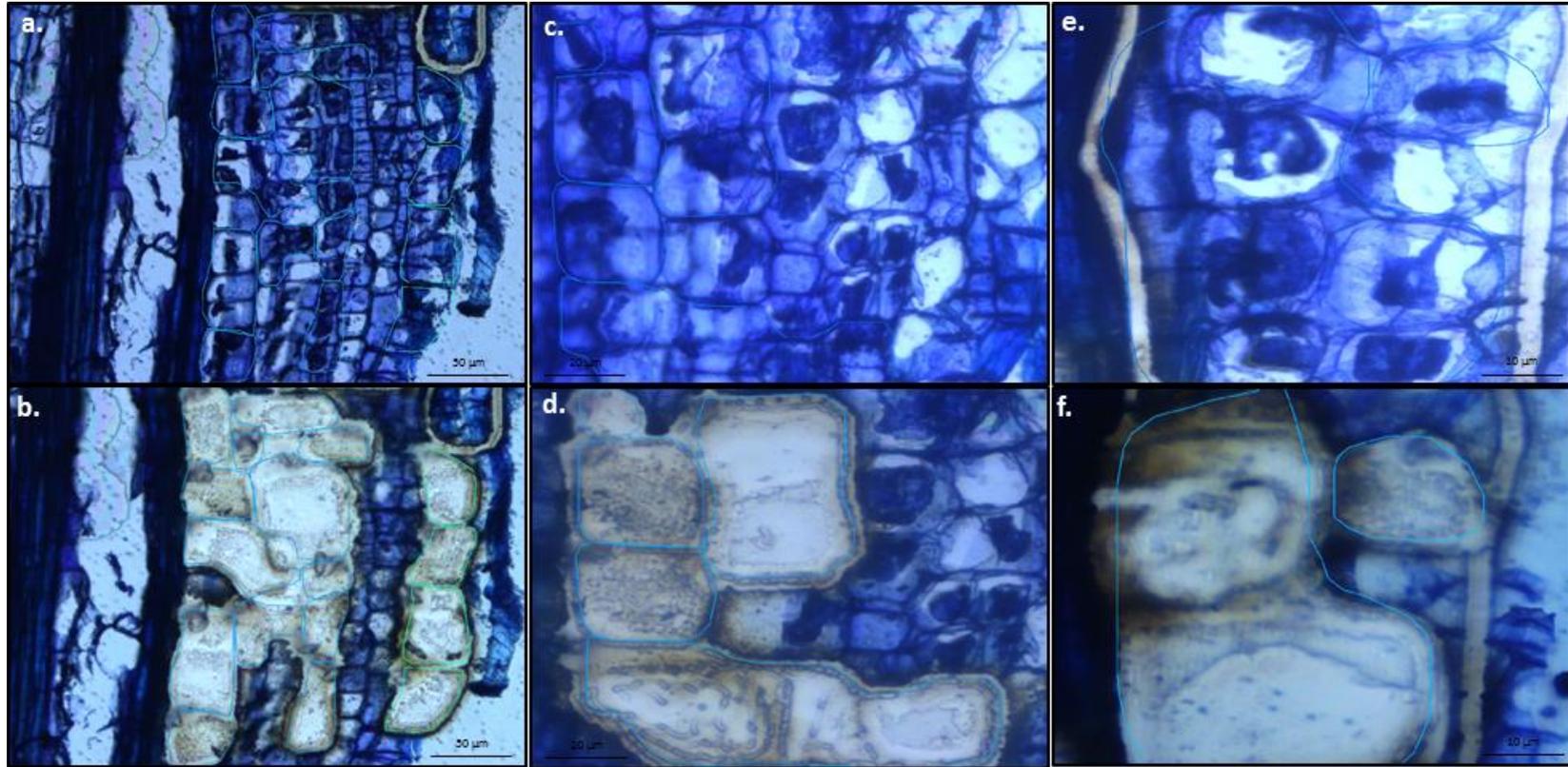


Figura 6.3 – Prancha 1 para as fotos de feijoeiro inoculadas com FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) obtidas através de sistema de microscopia por dissecção a laser. a. selecionadas em azul estão as células que irão compor a amostra Myc+ (células de córtex radicular contendo FMA) e em verde células de epiderme não arbusculadas (Myc-). b. Figura a. em aumento de 20x mostrando a dissecção já realizada. c. seleção de células Myc+ em aumento de 45x. d. amostra c já microdissecada. e. seleção de células Myc+ em aumento de 60x. f. amostra e já microdissecada.

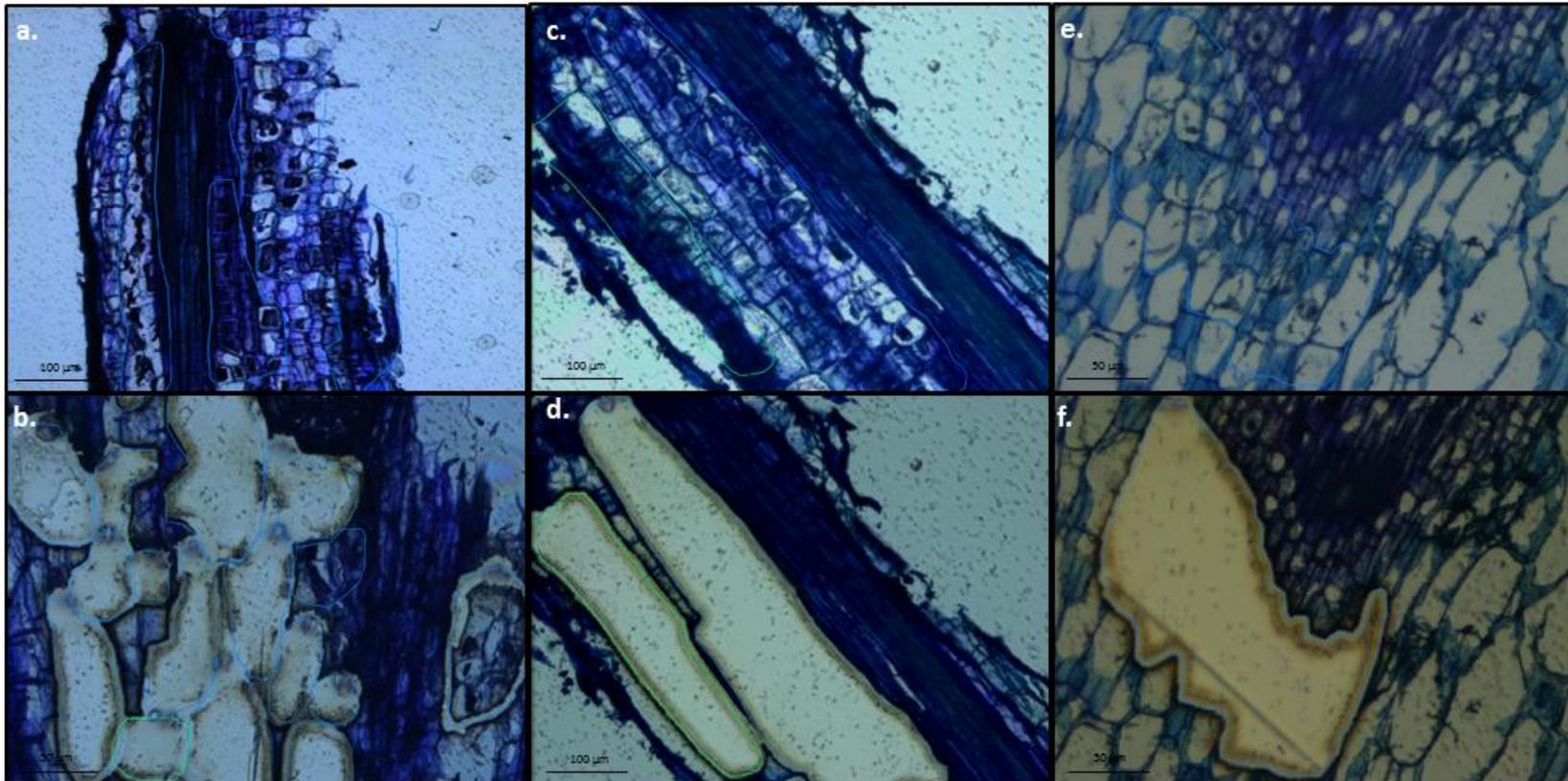


Figura 6.4 – Prancha 2 para as fotos de feijoeiro inoculadas com FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) obtidas através de sistema de microscopia por dissecção a laser. a. selecionadas em azul estão as células que irão compor a amostra Myc+ (células de córtex radicular contendo FMA). b. Figura a. em aumento de 20x mostrando a dissecção já realizada. c. selecionadas em azul estão as células que irão compor a amostra Myc+ (células de córtex radicular contendo FMA) e em verde células de epiderme não arbusculadas (Myc-). d. A dissecção já realizada. e. seleção de células ctrl. f. amostra e já microdissecada.

### 6.3.3 Análise semi-quantitativa por densitometria em gel de agarose dos produtos de RT-PCR

A caracterização dos perfis de expressão dos 23 transcritos selecionados em cada um dos tipos celulares amostrados (Myc+, Myc- e ctrl) foi obtida por meio de RT-PCR. Cinco ciclos diferentes de amplificação por PCR (30, 34, 38, 42 e 46) foram testados para cada transcrito com o objetivo de encontrar a melhor faixa de amplificação onde os produtos poderiam ser contrastados levando-se em consideração as três amostras estudadas (Figura 6.5).

A seleção do ciclo de amplificação mais apropriado para cada primer foi feita selecionando-se o primeiro ciclo a partir do qual a amplificação dos transcritos se tornava mais estável dentro do padrão geral obtido para cada gene. Selecionado o ciclo de amplificação, os perfis de banda obtidos para cada amostra foram quantificados quanto a intensidade por meio de densitometria em gel de agarose, afim de se estipular o quanto de produto foi gerado para cada tipo celular e primer analisado (Figura 6.6).

De todos os transcritos analisados, dois deles, *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* e *PIP2,3*, foram amplificados somente em células Myc+ (córtex micorrizado) indicando uma possível indução local restrita às células que contiveram arbúsculos em algum período do seu desenvolvimento. Cinco outros transcritos, *BHLH95*, *Cytokinin dehydrogenase*, *bzip*, *K+/H+ antiporter* e  *$\alpha/\beta$  hydrolase*, amplificaram somente em tecidos de córtex radicular tanto para as amostras Myc+ quanto Ctrl. Destes, *BHLH95* exibiu bandas mais intensas em Ctrl, contrário do padrão esperado a partir dos dados de RNA-Seq (Capítulo 3 – 7.6.3). Este resultado também foi observado em outros trabalhos que selecionaram transcritos para análises de LCM a partir de dados de análises transcritômicas obtidas de órgãos completos, sendo que o padrão de expressão destes genes em outros tipos celulares (tecido vascular, tecido meristemático) podem influenciar no perfil final obtido em transcritomas globais (HOGKAMP et al., 2011).

Os demais genes apresentaram amplificação para todos os tipos celulares abordados. *Apoptotic ATPase*, *Zinc Finger HD*, *apg9*, *Lipase*, *Utp23*, *RCC1* e *Glucose dehydrogenase* apresentaram maior densidade de banda em Myc+. *SRF-type (MADS-box)*, *PvNAC4*, *NAM28*, *hAT transposase*, *NAM4*, *LEA5* e *PIP2,5* apresentaram maior densidade de banda em Myc-. *Protease inhibitor* e *terpene synthase* apresentaram maior densidade de banda em Ctrl.

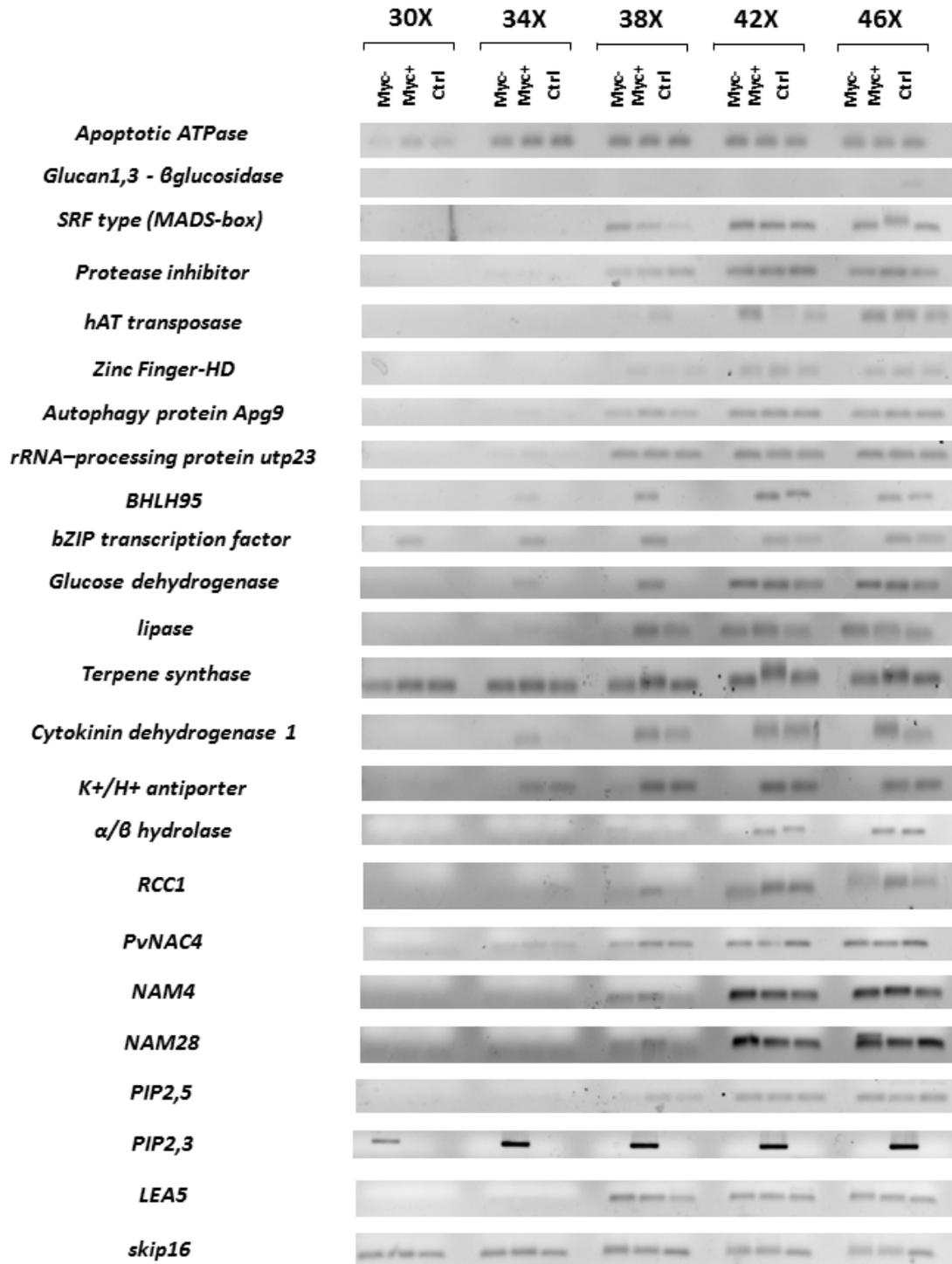


Figura 6.5 – Perfil de amplificação dos produtos de reação de RT-PCR obtidos para os 23 transcritos selecionados e as três amostras: Myc+ (células de córtex radicular de BAT 477 inoculado com FMA); Myc- (células de epiderme radicular de BAT 477 inoculado com FMA); ctrl (células de córtex radicular de BAT 477 controle não-colonizado por FMA); as plantas encontravam-se sob déficit hídrico de 96 h.

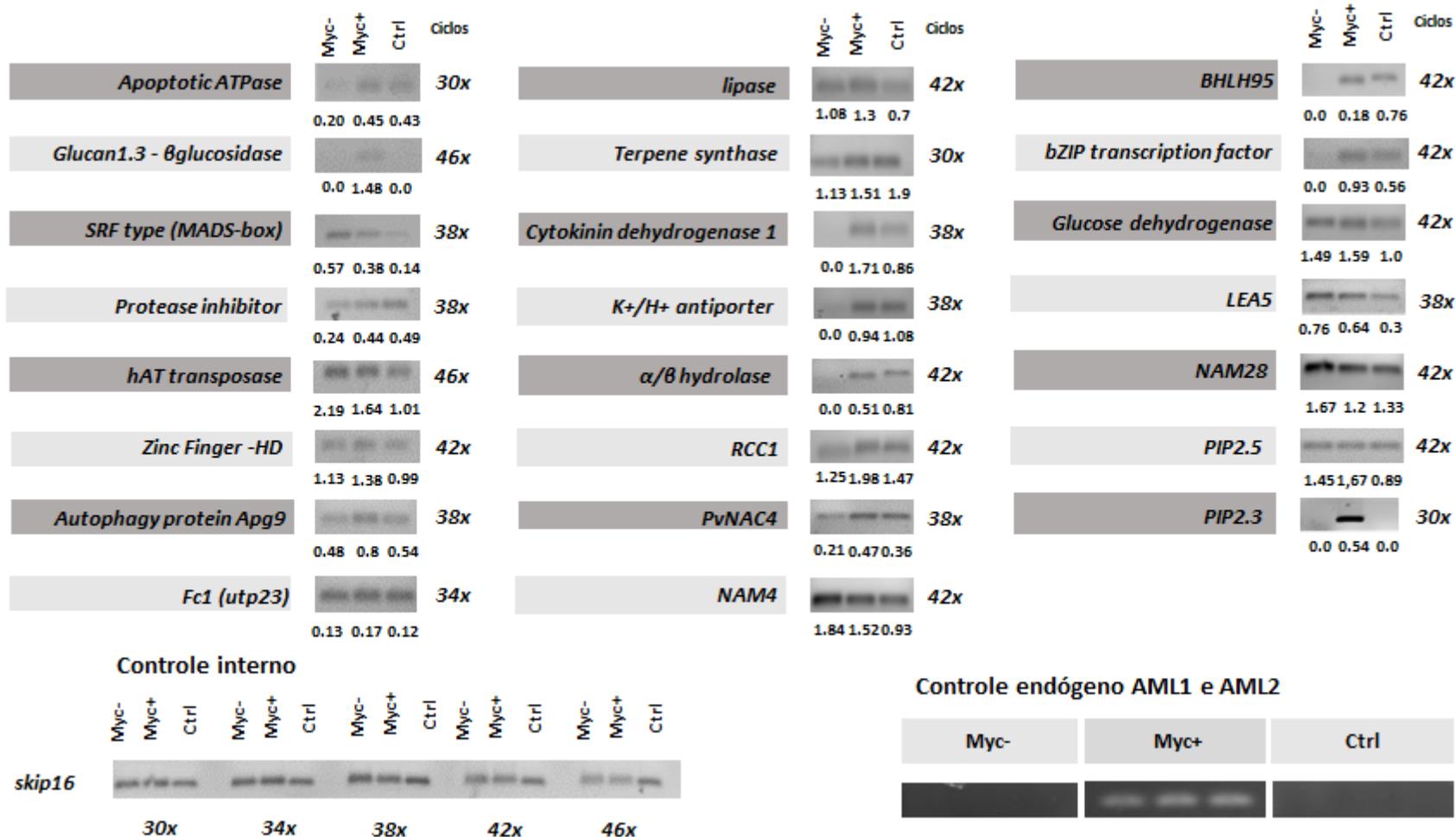


Figura 6.6 – Análise semi-quantitativa por densitometria em gel de agarose (1,2%) obtida a partir da amplificação dos 23 transcritos e as três amostras consideradas: Myc+ (células de córtex radicular de BAT 477 inoculado com FMA); Myc- (células de epiderme radicular de BAT 477 inoculado com FMA); ctrl (células de córtex radicular de BAT 477 controle não-colonizado por FMA); as plantas encontravam-se sob déficit hídrico de 96 h. O melhor ciclo de amplificação obtido para cada gene está evidenciado. Controle interno (gene de referência) e controle endógeno (comprovando a presença de estruturas de FMA em cada replicata biológica).

### 6.3.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

Uma análise de expressão gênica foi conduzida através da técnica de RT-qPCR comparando-se os perfis de expressão entre os diferentes tecidos analisados. Foram realizadas duas quantificações relativas: Myc+/Myc- para verificar a indução/repressão de genes entre células contendo arbúsculos e as células da epiderme não-arbusculadas de plantas inoculadas por FMA, e Myc+/Ctrl para verificar se as variações observadas se devem a uma regulação típicas das células do córtex ou se são determinadas pela presença de FMA.

Como esperado, pelos padrões já observados de densitometria em gel de agarose, para os genes *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* e *PIP2,3* só conseguimos detectar expressão na amostra Myc+, não sendo possíveis os cálculos de expressão relativa para estes transcritos. Dos demais 21 transcritos analisados, 15 geraram valores de quantificação de expressão gênica relativa para ambas as condições (Figura 6.7), e seis somente para uma das condições (Figura 6.8).

A indução da expressão de *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* em raízes de plantas colonizadas por FMA como forma de resposta a estresses ambientais foi revisada na Sessão 5. Quanto à *PIP2,3*, uma série de transportadores transmembranares, como as aquaporinas, vem sendo apontados como exclusivamente expressos na membrana periarbuscular, uma modificação da membrana plasmática das células corticais do hospedeiro que funciona como uma interface de troca e interação com o fungo (UEHLEIN et al., 2007). A detecção de expressão desse transcrito somente nas células Myc+ pode indicar um mecanismo exclusivo de troca de água e solutos entre o fungo e a planta.

Sobre os demais transcritos analisados, *RCC1* apresentaram padrões de expressão que validam aqueles apresentados em RNA-Seq, indicando um possível viés na técnica de densitometria. *RCC1* sofreu repressão em ambas as comparações realizadas indicando que este pode ser um mecanismo pelo qual o fungo atua na planta para a regulação da expressão gênica.

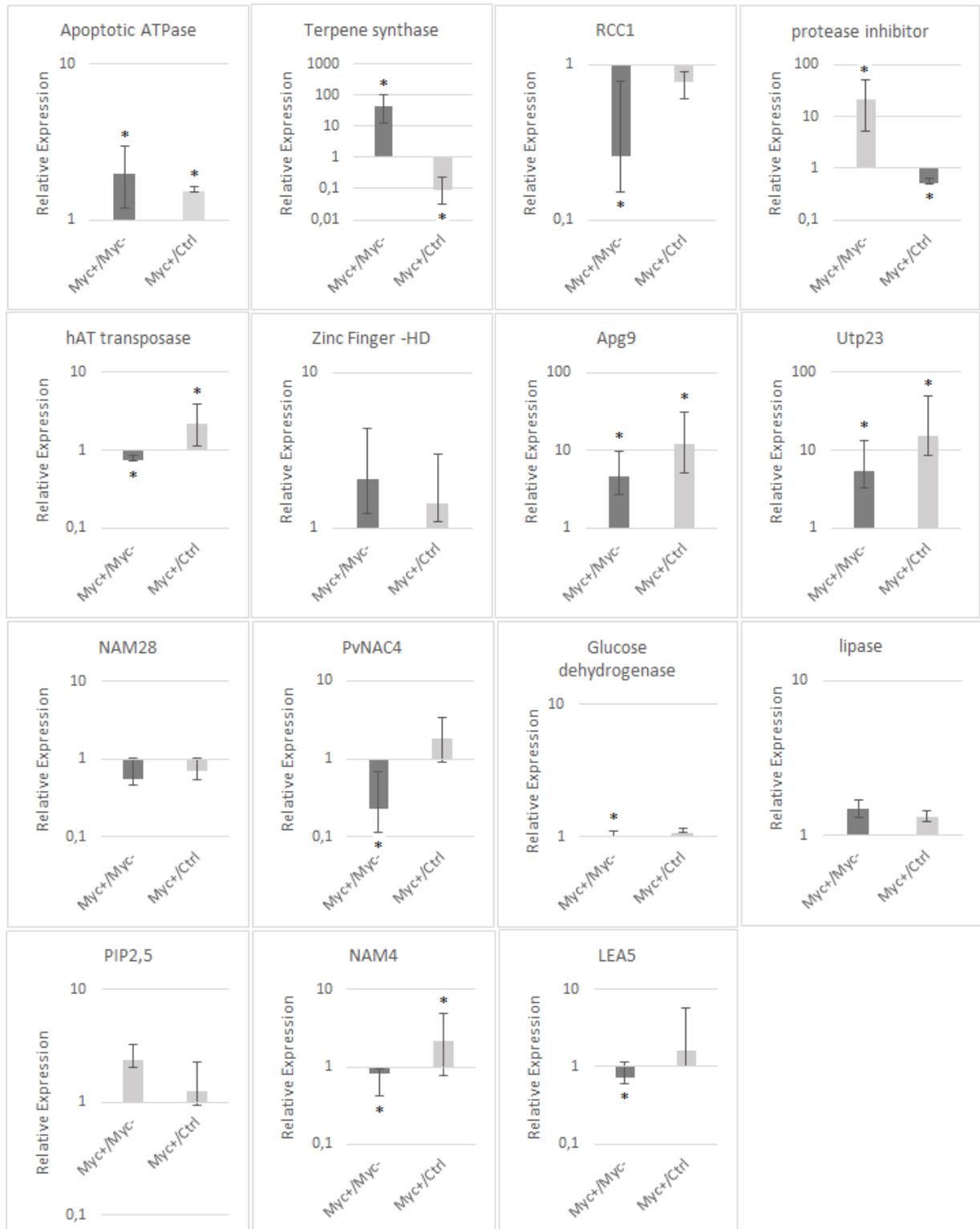


Figura 6.7 - Perfis de expressão gênica (razão Log2) obtidos por RT-qPCR para os 15 genes que produziram quantificação relativa para ambas as condições analisadas. Legenda: Myc+ (células de córtex radicular de BAT 477 inoculado com FMA); Myc- (células de epiderme radicular de BAT 477 inoculado com FMA); ctrl (células de córtex radicular de BAT 477 controle não-colonizado por FMA); as plantas encontravam-se sob déficit hídrico de 96 h.

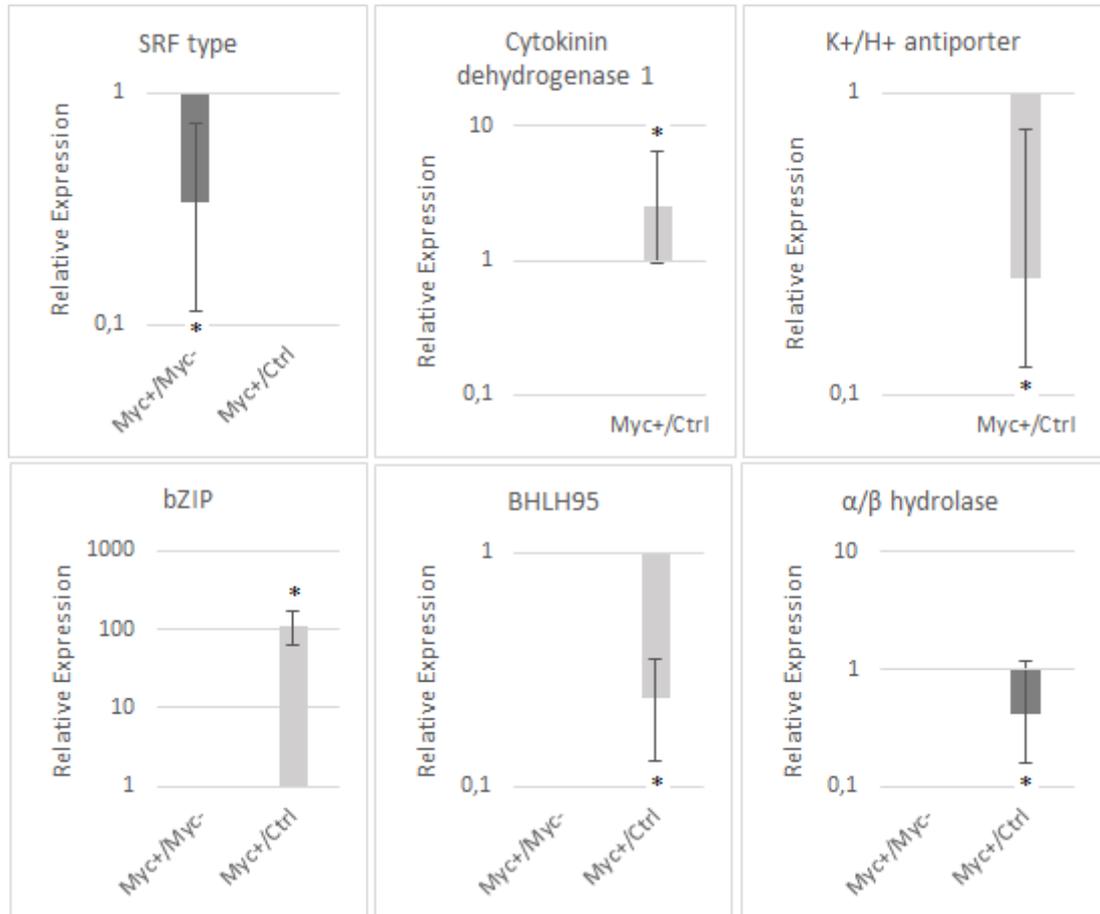


Figura 6.8 - Perfis de expressão gênica (razão Log<sub>2</sub>) obtidos por RT-qPCR para os 6 genes que produziram quantificação relativa para apenas uma das condições analisadas. Legenda: Myc+ (células de córtex radicular de BAT 477 inoculado com FMA); Myc- (células de epiderme radicular de BAT 477 inoculado com FMA); ctrl (células de córtex radicular de BAT 477 controle não-colonizado por FMA); as plantas encontravam-se sob déficit hídrico de 96 h.

Outro transcrito, *NAM28*, apresentou também diferenças em relação aos dados de densitometria (Figura 6.7). *NAM28*, assim como mostrado na densitometria, parece ser de fato mais expresso na epiderme do que no córtex de plantas, entretanto sua expressão sofreu menos indução em células contendo arbusculos comparando-se ao controle (Ctrl). Levando-se em conta os dados de expressão global deste gene em raízes discutido na Sessão 3 que apontavam uma menor repressão deste fator de transcrição em raízes inoculadas após 96 h de déficit hídrico, um possível mecanismo de indução por sinalização na epiderme a partir do córtex pode estar presente. O fator de transcrição *SRF type* (*MADS-box*) deve passar por um mecanismo similar de controle daqueles apresentados por *NAM28*. Este transcrito foi evidenciado por densitometria, porém não deve ter produzido cópias suficientes para ultrapassar o *threshold* em RT-qPCR e de forma similar a *NAM28* tem uma indução maior em epiderme (Myc-) do que no córtex (Myc+) (Figura 6.8).

Outros dois fatores de transcrição *PvNAC4* e *NAM4*, além de *LEA5* apesar de sofrerem indução em células contendo arbúsculo em relação ao controle não-inoculado (Myc+/Ctrl), apresentaram maior indução de expressão na epiderme sendo mais três possíveis exemplos de indução de expressão por sinalização (Figura 6.7). *Cytokinin dehydrogenase* e *BHLH95* só foram detectados em células do córtex radicular sendo o primeiro induzido na presença de FMA e o segundo reprimido (Figura 6.8). Os demais genes foram todos induzidos em condição de déficit hídrico em células de tecido micorrizado.

#### 6.4 Conclusões

O processo de colonização das raízes de plantas por FMA é um fenômeno dinâmico. Arbúsculos novos são gerados ao mesmo tempo em que estruturas antigas são fagocitadas pela planta, podendo ainda uma única célula ser simultânea/sucessivamente colonizada mais de uma vez durante o seu desenvolvimento. Dessa forma, experimentos envolvendo transcritomas globais podem mascarar o verdadeiro papel desempenhado por determinados genes durante a interação da planta com o fungo. O uso da tecnologia de LCM se mostrou bastante interessante em nosso trabalho para indicar quais genes podem estar de fato sofrendo indução de expressão em células contendo arbúsculos, ou mesmo em outros tecidos, como a epiderme, por efeito de indução por sinalização. A maior parte destes genes demonstrou ser expressa em células do córtex de plantas não-colonizadas por FMA revelando mais uma vez que o controle exercido por FMA durante a resposta do feijoeiro ao déficit hídrico pode estar muito mais atrelado a modulação de um perfil de expressão gênica já exibido pela planta do que amparado na expressão de genes novos ou exclusivos.

#### Referências

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**, St. Paul, v. 20, n. 9, p. 1055–1062, 2007.

BALESTRINI, R.; LANFRANCO, L. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 16, n. 8, p. 509–524, 2006.

EMMERT-BUCK, M. R.; BONNER, R. F.; SMITH, P. D.; CHUAQUI, R. F.; ZHUANG, Z.; GOLDSTEIN, S. R.; WEISS, R. A.; LIOTTA, L. A. Laser capture microdissection. **Science**, Washington, DC, v. 274, n. 5289, p. 998–1001, 1996.

FEDER N, O. T. P. Plant Microtechnique: some principles and new methods. **Nature**, London, v. 55, n. 1, p. 123–142, 1968.

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

GAUDE, N.; BORTFELD, S.; DUENSING, N.; LOHSE, M.; KRAJINSKI, F. Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. **Plant Journal**, Chichester, v. 69, n. 3, p. 510–528, 2012.

GOMEZ, S. K.; JAVOT, H.; DEEWATTHANAWONG, P.; TORRES-JEREZ, I.; TANG, Y.; BLANCAFLOR, E. B.; UDVARDI, M. K.; HARRISON, M. J. Medicago truncatula and Glomus intraradices gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 10, 2009.

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

HOGKAMP, C.; ARNDT, D.; PEREIRA, P. A.; BECKER, J. D.; HOHNJEC, N.; KUSTER, H. Laser Microdissection Unravels Cell-Type-Specific Transcription in Arbuscular Mycorrhizal Roots, Including CAAT-Box Transcription Factor Gene Expression Correlating with Fungal Contact and Spread. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, n. 4, p. 2023–2043, 2011.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, Boston, v. 27, n. 137, p. 20, 1968.

OLDROYD, GILES E D, HARRISON MARIA J, P. U. Reprogramming Plant Cells for Endosymbiosis. **Science**, Washington, DC, v. 753, n. 2009, p. 753–755, 2014.

PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 763–775, 2008.

RAPPARINI, F.; PEÑUELAS, J. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In: MIRANSARI, M. (Ed.). **Use of microbes for the alleviation of soil stresses**. 1. ed. New York: Springer, 2014. p. 21–42.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, DC, v. 289, n. 5486, p. 1920–1921, 2000.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M. H.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J. B.; MOORMAN, a. F. M. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 37, n. 6, e45, 2009.

SMITH, S.; SMITH, F. Tansley review No. 20. structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. **New Phytologist**, Oxford, v. 114, n. 20, p. 1–38, 1990.

UEHLEIN, N.; FILESCHI, K.; ECKERT, M.; BIENERT, G. P.; BERTEL, A.; KALDENHOFF, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 68, n. 1, p. 122–129, 2007.

## 7 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DO SISTEMA MODELO DE INTERAÇÃO FEIJOEIRO – FMA REVELAM ALTERAÇÕES NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS FUNGOS DURANTE A OCORRÊNCIA DE DÉFICIT HÍDRICO

### Resumo

A simbiose mutualística estabelecida entre FMA e plantas é considerada o elemento vital que permitiu a evolução das plantas terrestres durante o período Paleozóico. FMA exercem uma função vital sobre a capacidade das plantas em absorverem nutrientes, principalmente o fósforo, e água a partir do solo. Além disso, são bastante conhecidas por melhorarem a performance das plantas frente a uma série de estresses de origem biótica e abiótica. Nos últimos anos, diversos estudos têm se valido de técnicas de biologia molecular para investigar como a interação com FMA podem influenciar na regulação gênica em plantas. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o impacto da simbiose sobre os perfis de expressão gênica em FMA. Neste estudo, dados de RNA-Seq gerados a partir de dois transcritomas obtidos da interação entre feijoeiro (cv. BAT 477) e FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) expostos a um déficit hídrico de 96 h e condições normais de irrigação, foram analisados sob a perspectiva dos fungos utilizando-se o genoma de referência da espécie modelo *Rizophagus irregularis*. Um conjunto de 171 transcritos foi identificado como diferencialmente expressos em FMA durante a ocorrência do déficit hídrico durante a interação com feijoeiro, alguns deles associados a processos importantes de resposta à seca como acúmulo de prolina, resposta a estresse oxidativo, fatores de transcrição e biossíntese de glicogênio, sendo que cinco deles foram descritos como exclusivamente expressos na mistura de FMA durante a ocorrência do estresse e três sob a condição controle. Dos onze transcritos relacionados a processos de crescimento e desenvolvimento celular, dez foram reprimidos durante o estresse indicando uma possível estratégia de sobrevivência relacionada a redução na ramificação do micélio. Este estudo revela a criação de uma importante base de dados contendo genes candidatos que poderão ser empregados no desenvolvimento de marcadores moleculares com o objetivo de selecionar inóculos com maior potencial para o melhoramento das relações hídricas de culturas agrícolas usualmente expostas a eventos de seca.

Palavras-chave: FMA. Mutualismo. Prolina. Glicogênio. Déficit hídrico.

**Abstract**

The mutualistic symbiosis established between AMF and plants is considered the vital element that allowed the evolution of terrestrial plants during the Paleozoic period. AMF exert a pivotal function over plants' ability to absorb nutrients, especially phosphorus, and water from the soil. Moreover, they are known to improve plants' performance under a variety of biotic and abiotic stresses. In the last years, a series of studies have made use of molecular techniques in order to investigate how the interaction with AMF can influence gene expression regulation in plants. However, the impact of the symbiosis over the fungal gene expression is still not clear. In this study, a RNA-Seq data generated from two transcriptomes, obtained from the interaction between common beans (BAT 477) and AMF (*G. clarum*, *A. scrobiculata*, *G. rosea*) exposed to a water deficit regime of 96 h and well-irrigated control, were analysed under the fungal partner's perspective taking the AMF model *Rizophagus irregulares* as a reference. A set of 171 transcripts were identified as differentially expressed in the AMF mixture during drought, some of them associated to important processes of response to water deficit such as proline accumulation, response to oxidative damage, transcription factors and glycogen biosynthesis, being five of them exclusively expressed during stress and three under control. From the eleven transcripts associated to cellular growth and development, ten were downregulated under stress indicating a possible strategy of defense related to mycelium ramification reduction. This study points to an important database containing candidate genes for the development of molecular markers that could be applied for the selection of inoculum with an advanced capability of improving the water relations of agricultural crops that are usually exposed to drought stress events.

**Keywords:** AMF. Mutualism. Proline. Glycogen. Water Deficit.

## 7.1 Introdução

A simbiose mutualística estabelecida entre os fungos pertencentes ao grupo Glomeromycota, um filo bastante distinto dentro do reino Fungi, e cerca de 80% das espécies de plantas, é hipotetizada como a responsável por promover, durante o período Paleozóico, a evolução das plantas terrestres a partir de gametófitos que não formavam raízes para esporófitos que formam raízes (REMY et al., 1994; REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000). Esta associação é especialmente vital para a manutenção dos ecossistemas devido à elevada dependência por parte das plantas para a absorção de nutrientes do solo, principalmente o fósforo.

O filo Glomeromycota compreende cerca de 200 morfo-espécies que tradicionalmente são distinguidas por padrões de parede celular dos esporos, embora variações genéticas relativas ao DNA ribossomal e em outras regiões do genoma tenham sido apontadas (REDECKER; RAAB, 2006; SANDERS; CROLL, 2010). As hifas são tipicamente cenocíticas e o citoplasma pode conter núcleos múltiplos. Não possuem um ciclo sexual conhecido, e se reproduzem clonalmente através da produção de esporos multi-nucleados (SANDERS, 1999). Entretanto, a presença de uma maquinaria meiótica extremamente conservada pode acabar permitindo a troca de material genético entre indivíduos (CROLL; SANDERS, 2009). Uma outra hipótese é de que as FMA possam manter um conjunto de núcleos diferentes entre si (heterocariose) e transmití-los através das gerações (HIJRI; SANDERS, 2005).

A colonização das plantas por FMA conduz para alterações quantitativas e qualitativas no transcrito do hospedeiro. Entretanto, a regulação da expressão gênica nos parceiros simbiotes FMA fruto dessa interação com a raiz tem sido muito pouco explorada. Gomez et al. (2009) reportaram que genes de *Glomus intraradices* estão representados no *Affymetrix GeneChip® Medicago Genome Array* de *M. truncatula*, sendo que 49 sondas foram identificadas como genes putativos do fungo já que foram detectadas somente através da hibridização com cDNA de raízes obtidas da interação *M. truncatula/G. intraradices*. Gaude et al. (2012), detectaram diferenças na regulação em 15 destes genes em experimento similar derivado de amostras celulares obtidas por LCM. O transcrito completo de *G. intraradices* (DAOM 197198), foi recentemente publicado e consiste de um conjunto de 25.906 transcritos virtuais derivados de esporos germinados, micélio extraradicular e raízes colonizadas (TISSERANT et al., 2012). Um *oligoarray* foi gerado a partir dos transcritos virtuais e das 18.751 sequências codificadoras detectadas, 395 delas foram induzidas/reprimidas em micélio extraradicular, e 276 sofreram diferença de regulação em raízes colonizadas, quando comparados aos esporos germinados (TISSERANT et al., 2012).

Estudos complementares envolvendo transcritomas se fazem necessários para melhor compreender como as mudanças genéticas da planta podem modificar o perfil de expressão gênica em fungos e dessa forma produzir informações que possam ser úteis no sentido de selecionar os genótipos de FMA mais adequados para o estabelecimento da simbiose e a promoção da performance da cultura agrícola desejada (ANGELARD et al., 2010). No presente trabalho, o modelo de interação feijoeiro – FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata*, *Gisgaspora rosea*) foi adotado. Plantas do genótipo BAT 477 de feijoeiro colonizadas, ou não, pela mistura de FMA foram expostas a um período de 96 h de déficit hídrico caracterizado pela interrupção completa de irrigação e o transcritoma global dessas raízes foi obtido por RNA-Seq. As sequências obtidas foram mapeadas e anotadas em relação ao genoma de referência de FMA descrito para a espécie *Rizopagus irregulares* (antigo *G. intraradices* DAOM 197198) (TISSERANT et al., 2013) com o objetivo de encontrar alterações nos perfis de expressão gênica dos fungos durante a interação com o feijoeiro e a presença a ocorrência de déficit hídrico.

## 7.2 Material e Métodos

### 7.2.1 Pipeline empregado nas análises de bioinformática

A obtenção dos dados brutos de sequenciamento *paired-end* gerados pelo HiScan<sup>TM</sup>Sq System (illumina®) foi realizada por intermédio do programa CASAVA 1.8.2 (fornecido pela illumina®) que gera o *base call* dos dados brutos e os transforma em reads no formato *fastq* acompanhados dos scores de qualidade phred ( $\geq 20$ , médio 36). Os reads foram avaliados utilizando-se o programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/publications.html>). A filtragem dos reads de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa SeqyClean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean>), utilizando como cutoff bases com qualidade inferior a 24QScore. A base de dados de contaminantes usada foi a Univec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>). Após filtragem, reads com comprimento inferior a 65 bp foram removidos.

A versão sem mascaramentos (*unmasked*) do genoma de *R. irregularis* disponível em Phytozome foi utilizada para as análises de mapeamento (<http://genome.jgi-psf.org/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=Gloin1>). A indexação do genoma foi realizada utilizando a ferramenta Bowtie 2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). O mapeamento individual das amostras foi realizado através do pacote TopHat (TRAPNELL;

PACHTER; SALZBERG, 2009) utilizando-se ambos os arquivos *paired-end*, o genoma indexado e os arquivos *gff* de anotação disponíveis em Phytozome.

A montagem dos transcritos em relação aos arquivos de mapeamento individuais foi obtida a partir da ferramenta cufflinks do pacote Cufflinks (TRAPNELL et al., 2010), utilizando-se o mesmo arquivo *gff* de anotação para referência. Os arquivos individuais de montagem dos transcriptomas foram unidos através da ferramenta cuffmerge utilizando-se o arquivo inicial *gff* de anotação para a padronização dos termos de referência (IDs – identificadores). Este arquivo foi então comparado ao arquivo inicial de anotação utilizando-se a ferramenta cuffcompare para a produção de um arquivo único de GTF de referência para as nossas condições de experimentação (transcritos novos/ já anotados, novas variantes de splicing, transcritos localizados em um intron).

Esse arquivo foi usado como a anotação oferecido à ferramenta Cuffdiff para a extração das contagens brutas dos reads. Para obtenção dos DEs (*genes diferencialmente expressos*), após obtenção das contagens, os grupos foram analisados usando o pacote CummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>), que está vinculado ao R/Bioconductor (GENTLEMAN et al., 2004). Dentro do programa CummeRbund os dados foram normalizados pelo pelos valores de FPKM (número de fragmentos por kilobase de exon modelo por milhão de reads mapeados) e foi realizado o teste binomial negativo de expressão para a remoção dos fragmentos com contagens normalizadas (ou *baseMean*) inferiores ao valor 5. Sobre o teste foi aplicada a correção de FDR- (<0,05) Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) para múltiplos testes a fim de evitar os erros tipo I, ou seja, os falsos positivos.

A anotação dos 171 DEs (selecionados a valor q ajustado de significância a FDR<0,05) foi obtida através da função blastx com cutoff 1e-10 (pacote blast+ - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52640/>) utilizando como referência a base de dados *Glomeromycetes* do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), data: 07/07/2015). A classificação funcional pelos termos de ontologia gênica (GO) foi feita através do programa Blast2GO (CONESA et al., 2005) a partir de 10 hits do Blast para cada contig. As anotações foram validadas através da busca por motivos conservados na base de dados do Pfam através da ferramenta Motif Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>).

## 7.3 Resultados e Discussão

### 7.3.1 Quantificação e qualidade das amostras de RNA-total, pré-processamento e análise das sequências

Para estas análises, somente foram consideradas as duas bibliotecas de RNA-Seq construídas a partir do sequenciamento *paired-end* das triplicatas biológicas referentes aos tratamentos Myc+/seca e Myc+/ctrl. Os sequenciamentos geraram *reads* de em média 101 pb, com conteúdo de GC de 45% e valor Phred = 36 (Anexo VI). Após a filtragem dos reads de menor qualidade e a remoção de adaptadores e vetores a quantidade média de reads para cada biblioteca foi: 199.338 para myc+/seca; 29.407 para myc+/ctrl; (Tabela 8.1). A taxa média de alinhamento dos reads de cada amostra em relação ao genoma de referência de *R. irregularis* foi: 0,3 % para myc+/seca; 0,1% para myc+/ctrl (Tabela 7.1). Embora o percentual de reads mapeados em relação ao genoma de referência tenha sido pequeno para cada amostra, o número total de reads obtidos em cada replicata ainda foi grande o suficiente para justificar nossas análises.

Tabela 7.1 – Dados referentes ao mapeamento dos reads de RNA-Seq em relação ao genoma de referência do feijoeiro disponível em Phytozome. Legenda: Myc+: plantas inoculadas com FMA; Myc-: plantas não-micorrizadas; seca: déficit hídrico de 96 horas; ctrl: controle irrigado regularmente; #: número de sequências.

Amostras	Reads Mapeados	Alinhamentos Múltiplos	Taxa de mapeamento dos Reads (%)	Pares Alinhados	Alinhamento (%)
1. Myc+/seca	145257	13892	0.7	33099	0.3
2. Myc+/seca	246490	27813	0.7	58273	0.3
3. Myc+/seca	206268	176262	0.7	30006	0.3
1. Myc+/ctrl	7462	420	0.2	1489	0.1
2. Myc+/ctrl	55743	2770	0.2	10139	0.1
3. Myc+/ctrl	25015	1579	0.2	4991	0.1

### 7.3.2 Análise de expressão gênica diferencial dos dados de RNA-Seq

Comparando-se ambos os perfis de expressão gênica da mistura de FMA, obtidos para os tratamentos myc+/seca e myc+/ctrl, foi possível identificar de variação no número de reads alinhados (contigs) em relação a alguns dos grupos de transcritos considerados para as análises de Expressão Gênica Diferencial (Figura 7.1), sendo que esta variação foi capaz de gerar diferenças significativas (valor corrigido de q a  $FDR < 0,05$ ) em nível de expressão gênica comparando-se os dois conjuntos de transcritos obtidos para tratamento e controle (Figura 7.1). De fato, o gráfico-de-caixa gerado na Figura 7.2a evidencia uma menor variação nos níveis de expressão gênica (em valores de FPKM na razão Log10) para o tratamento controle do que para

a condição de estresse, que se reflete numa maior densidade de genes produzindo os mesmos valores de expressão (um pico definido) em relação ao tratamento sob seca (tendência de formação de dois picos) (Figura 7.2b).

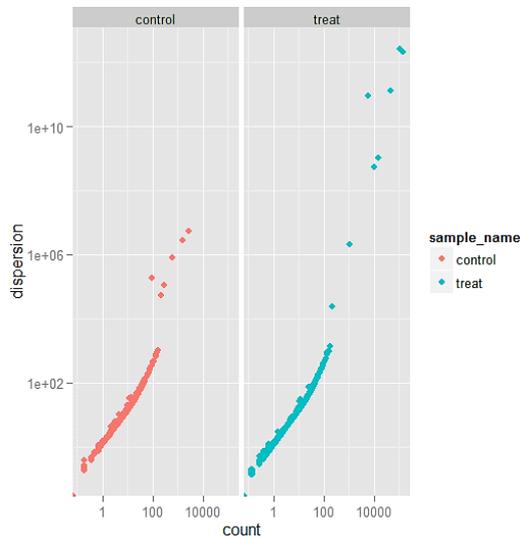


Figura 7.1 – Gráfico de dispersão confrontando as contagens individuais dos transcritos relativas a cada tratamento. Legenda: Control: plantas inoculadas por FMA irrigadas regularmente; Treat: plantas inoculadas por FMA sob déficit hídrico de 96 h.

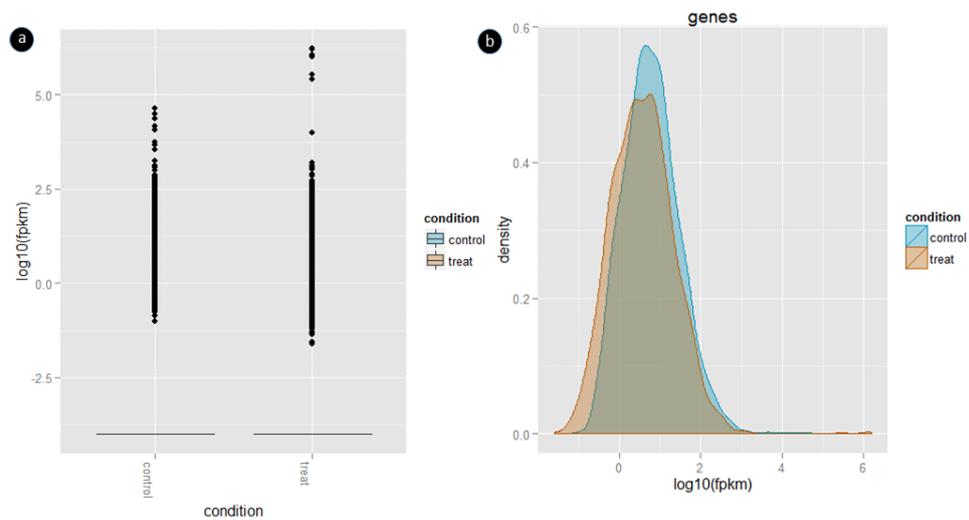


Figura 7.2 – a. Gráfico de caixa para a distribuição dos valores de FPKM em cada um dos tratamentos analisados. b. Gráfico de densidade de distribuição dos valores de FPKM para cada uma das condições. Legenda: Control: plantas inoculadas por FMA irrigadas regularmente; Treat: plantas inoculadas por FMA sob déficit hídrico de 96 h.

Variações significativas foram obtidas nos perfis de expressão gênica obtidos em relação aos dois tratamentos (Figura 7.3). No total 171 DEGs exibiram diferença significativa de expressão gênica (valor q ajustado a FRD<0,05) comparando-se ambos os tratamentos (Tabela 7.2). O Heatmap da figura 8.4 relaciona o perfil de expressão dos 31 transcritos que sofreram maior regulação selecionados a partir de um valor q mais seletivo (FRD<0,01).

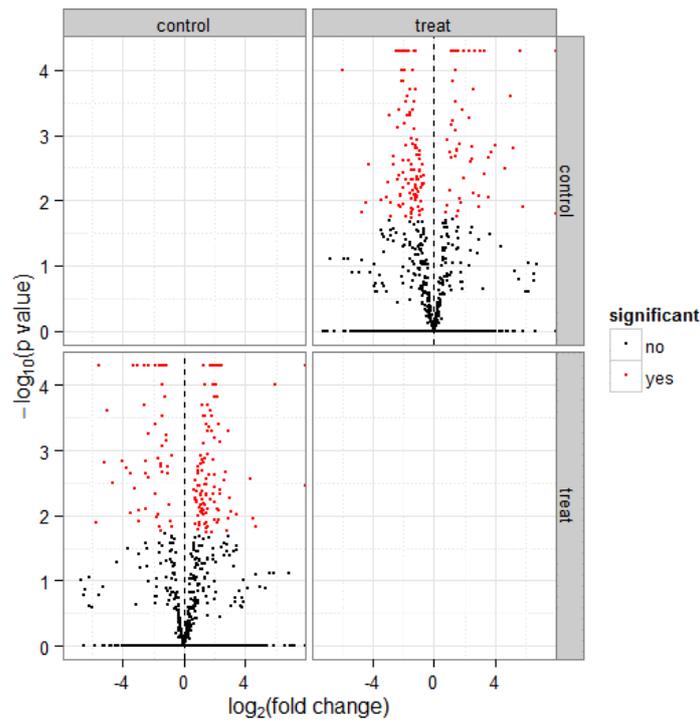


Figura 7.3 – Gráfico de Vulcano-plot correlacionando os valores individuais de expressão dos transcritos em FPKM com os respectivos valores de significâncias. Legenda: Control: plantas inoculadas por FMA irrigadas regularmente; Treat: plantas inoculadas por FMA sob déficit hídrico de 96 h.

Tabela 7.2 – Os 171 DEGs relativos a mistura de FMA com maior valor q ajustado a FDR<0,05 comparando-se os perfis de expressão gênica de myc+/seca e myc+/ctrl. Identificador das sequências na base de dados do JGI. Valores de expressão, indução (+) e repressão (-) em relação às plantas inoculadas com FMA sob seca. Padj (valor p ajustado a FDR < 0,05). Anotação funcional em relação as bases de dados do Phytozome e Pfam (1e-10). Classificação funcional relativa à base de dados do Gene Ontology. *inf* significa que a condição seca apresenta o read, mas ele não foi amostrado na situação controle e *-inf* indica o inverso.

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Função gênica putativa	Classificação Funcional
jgi,p Gloin1 342443	inf	0,000730645	partial	-
jgi,p Gloin1 342483	-2,24213	0,000730645	hypothetical protein GLOINDRAFT_342483	-
jgi,p Gloin1 343295	-1,28518	0,000730645	protein	Organização organela
jgi,p Gloin1 94512	1,33954	0,000730645	ubiquitin-conjugating enzyme e2	Peptidase
jgi,p Gloin1 167280	2,31988	0,000730645	transporter particle subunit trs31	-
jgi,p Gloin1 78465	-1,68226	0,000730645	ornithine decarboxylase	Mebolismo de prolina
jgi,p Gloin1 346678	1,37235	0,000730645	kinase-like protein	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 174380	2,30001	0,000730645	atp synthase gamma subunit	Atividade ATPase
jgi,p Gloin1 348398	inf	0,000730645	ubiquitin-conjugating enzyme	Peptidase
jgi,p Gloin1 349305	3,30062	0,000730645	transcription factor	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 59972	-inf	0,000730645	ste ste20 paka protein kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 336739,jgi,p Gloin1 67222	5,60659	0,000730645	pyrroline-5-carboxylate reductase	Mebolismo de prolina
jgi,p Gloin1 242959	-2,43123	0,000730645	ste like transcription factor	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 337610	-1,85576	0,000730645	nucleoside diphosphate kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 39239	-1,68839	0,000730645	60s ribosomal protein l16	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 334214	-1,67262	0,000730645	ubiquitin-conjugating enzyme e2 d e	Peptidase
jgi,p Gloin1 87168	1,23442	0,000730645	hypothetical protein RirG_173720	-
jgi,p Gloin1 338316	1,46748	0,000730645	mating type hmg box partial	-
jgi,p Gloin1 287866	-1,84233	0,000730645	mitochondrial peroxiredoxin prx1	Resposta a estresse oxidativo
jgi,p Gloin1 339825	-inf	0,000730645	protein arginine n-methyltransferase 1	Regulação epigenética
jgi,p Gloin1 11415	1,92475	0,000730645	regulatory protein cys-3 protein	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 88971	inf	0,000730645	hypothetical protein GLOINDRAFT_340172	-
jgi,p Gloin1 340252	-2,16745	0,000730645	atp-binding subfamily member 2	Atividade ATPase
jgi,p Gloin1 297125	-2,11989	0,000730645	proteasome regulatory particle subunit	Organização do proteossoma
jgi,p Gloin1 340466	3,02745	0,000730645	glycogen synthase	Metabolismo de carboidratos
jgi,p Gloin1 334513	1,61078	0,000730645	ring finger protein 13 precursor	Ligação a Zn <sup>+2</sup>
jgi,p Gloin1 340699	2,63333	0,000730645	upf0357 protein	-
jgi,p Gloin1 41774	inf	0,000730645	40s ribosomal protein s18	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 307424	-1,88161	0,000730645	14-3-3 protein	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 341178	1,16918	0,000730645	small gtp-binding protein domain	Transdução de sinais

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Função gênica putativa	Classificação Funcional
jgi,p Gloin1 341531	-2,36618	0,000730645		
jgi,p Gloin1 343353	-2,06608	0,00125833	actin-related protein	Organização de citoesqueleto
jgi,p Gloin1 77245	-1,8889	0,00125833	hypothetical protein GLOINDRAFT_86139	-
jgi,p Gloin1 334027	1,41931	0,00125833	mitochondrial tricarboxylate transporter	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 337617	-1,37519	0,00125833	60s ribosomal protein l44	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 44333	-5,93887	0,00125833	hypothetical protein GLOINDRAFT_338719	-
jgi,p Gloin1 343886	1,25086	0,00174231	cysteine proteinase	Peptidase
jgi,p Gloin1 40438	-2,00676	0,00174231	hypothetical protein RirG_085230	-
jgi,p Gloin1 256546	-2,13201	0,00174231	peanut-like protein 1 (cell division control like protein 1)	Crescimento/Desenvolvimento Celular
jgi,p Gloin1 343317	-1,15524	0,00215714	rna-binding protein rsd1	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 175263	-1,55243	0,00215714	rab18 family	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 340426	2,60445	0,00215714	hypothetical protein GLOINDRAFT_340466	Ligação a Zn <sup>+2</sup>
jgi,p Gloin1 336076	5,00536	0,00257386	hypothetical protein GLOINDRAFT_237777	-
jgi,p Gloin1 89921	-1,75574	0,00257386	pyruvate kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 344659	-1,31326	0,00283125	calcium-binding protein 39	Ligação a Ca <sup>+2</sup>
jgi,p Gloin1 65398	-1,83021	0,00283125	endoplasmic reticulum protein	Organização de organelas
jgi,p Gloin1 348050	-1,25592	0,00283125	mob kinase activator-like 1	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 209025,jgi,p Gloin1 349018	1,42525	0,00283125	helix-loop-helix dna binding protein	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 347366	1,86591	0,00355294	v-type atpase v0 subunit c	Atividade ATPase
jgi,p Gloin1 348864	-2,2636	0,00355294	heat shock protein 90-1	Resposta a estresse
jgi,p Gloin1 243564	-1,41716	0,00355294	60s ribosomal protein l9-a	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 348832	-1,58584	0,00392019	tpr repeat-containing protein	Interação proteína-proteína
jgi,p Gloin1 64722	-1,7648	0,00411818	s-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase	Metilação de proteína
jgi,p Gloin1 78367	-1,51322	0,00411818	chitin synthase export chaperone	Organização da parede celular
jgi,p Gloin1 335394	-2,87637	0,00411818	tata-box-binding protein	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 347362	2,33129	0,00444911	hypothetical protein GLOINDRAFT_184494, partial	-
jgi,p Gloin1 28818	1,19064	0,00476842	hypothetical protein RirG_047240	-
jgi,p Gloin1 87534	-1,94859	0,00507672	leucyl-trna synthetase	Regulação da tradução
jgi,p Gloin1 339934	1,17543	0,00537458	hypothetical protein GLOINDRAFT_11415	-
jgi,p Gloin1 334467	-2,38844	0,0056625	glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	Metabolismo de carboidrato
jgi,p Gloin1 337805	-1,26538	0,00594098	18s rna biogenesis protein rcl1	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 77397	1,40083	0,0061119	speckle-type poz protein a-like	Organização do proteossoma
jgi,p Gloin1 340172	1,40065	0,0061119	v-type proton atpase subunit b	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 348665	-1,50187	0,00813984	vea protein	-
jgi,p Gloin1 323689	0,840487	0,00823636	40s ribosomal protein s14	Organização ribossomal

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Função gênica putativa	Classificação Funcional
jgi,p Gloin1 303068	-1,12505	0,00823636	c2h2 zinc finger protein	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 343557	-1,34367	0,00899338	---NA---	-
jgi,p Gloin1 340143	1,70968	0,00899338	40s ribosomal protein s13	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 347725	-1,21158	0,00906	duf602-domain-containing protein	Ligação a ácidos nucleicos
jgi,p Gloin1 289070	-1,87116	0,00906	glycosyltransferase family 41 protein	Atividade transferase
jgi,p Gloin1 94365	4,00848	0,00925141	wd repeat protein	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 333922	2,51424	0,0094375	hypothetical protein GLOINDRAFT_180637	-
jgi,p Gloin1 239732	-1,22694	0,00948851	hypothetical protein MTR_5g051130	-
jgi,p Gloin1 67218	5,20411	0,00948851	nascent polypeptide-associated complex subunit beta	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 190897	-1,08093	0,009664	hypothetical protein GLOINDRAFT_347873, partial	Metabolismo energético
jgi,p Gloin1 237777	1,49053	0,00983487	hypothetical protein MTR_5g051130	-
jgi,p Gloin1 75978	1,51934	0,0101635	nadph dehydrogenase	Resposta a estresse oxidativo
jgi,p Gloin1 225679	-0,916347	0,0101635	hypothetical protein GLOINDRAFT_59972, partial	-
jgi,p Gloin1 349320	1,08023	0,0103215	uv excision repair protein rad23c	Reparo de DNA
jgi,p Gloin1 348967	3,78676	0,0104756	ph domain-like protein	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 337403	-0,929051	0,011325	autophagy-related protein 3	Morte celular
jgi,p Gloin1 338235	-1,14883	0,011325	sec14 cytosolic factor	Transporte
jgi,p Gloin1 339009	-2,67724	0,0115946	hypothetical protein GLOINDRAFT_9508, partial	Ligação a DNA
jgi,p Gloin1 340074	1,42214	0,0115946	aspartic peptidase a1	Peptidase
jgi,p Gloin1 342094	-0,898058	0,0118398	-	-
jgi,p Gloin1 132940	1,11123	0,0118398	Laa1p	Transporte
jgi,p Gloin1 346633	2,51624	0,0118398	cmgc mapk p38 protein kinase	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 341195	3,54587	0,0118398	ph-response transcription factor pacc rim101	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 73725	-1,66412	0,01208	transmembrane 9 superfamily member 3	Integrante de membrana
jgi,p Gloin1 196923	-2,02584	0,01208	rna polymerase rpb3 rpb11 dimerization domain-containing protein	Transcrição
jgi,p Gloin1 346931	2,36319	0,0129429	camk camkl ampk protein kinase	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 334527	-1,46798	0,0135408	transcription factor dp	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 341734	-0,743033	0,01359	low quality protein: calmodulin-a- partial	Ligação a Ca <sup>+2</sup>
jgi,p Gloin1 20578	-4,30065	0,01359	glycine-rich rna binding protein	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 339235	-2,65825	0,01359	kelch repeat protein	Interação proteína-proteína
jgi,p Gloin1 97458	4,68501	0,0151	partial	-
jgi,p Gloin1 343364	-0,895059	0,0156285	60s ribosomal protein l37	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 9433	-1,32385	0,0156285	carbohydrate esterase family 4 protein	Metabolismo de carboidratos
jgi,p Gloin1 9508	-inf	0,0156285	nop10p-domain-containing protein	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 340449	-1,46807	0,0156285	hypothetical protein GLOINDRAFT_334513	-

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Função gênica putativa	Classificação Funcional
jgi,p Gloin1 124206	-0,953725	0,0159223	hypothetical protein GLOINDRAFT_124206	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 338803	-1,97413	0,0164324	60s ribosomal protein l4	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 79885	3,27428	0,0171524	60s ribosomal protein l11	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 72139	-0,674786	0,0176409	eukaryotic translation initiation factor sui1	Fator de transcrição
jgi,p Gloin1 70100	-2,30569	0,0176886	signal peptide peptidase	Peptidase
jgi,p Gloin1 347984	-1,1358	0,0184164	agc ndr ndr protein kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 340996	-0,854161	0,0184164	probable ppg1-phosphoprotein phosphatase ppg catalytic chain	Fosfatase
jgi,p Gloin1 333823	-1,45778	0,0192121	cam1p	Regulação da tradução
jgi,p Gloin1 178675	1,91826	0,0192121	hypothetical protein RirG_093760	-
jgi,p Gloin1 347125	-1,86781	0,0192121	hypothetical protein GLOINDRAFT_347366	-
jgi,p Gloin1 348102	-1,05978	0,0192121	hypothetical protein GLOINDRAFT_198011	-
jgi,p Gloin1 70375	-2,33058	0,0192121	40s ribosomal protein s5	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 67971	-1,08954	0,0192425	atp synthase subunit beta	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 335833	-1,42103	0,0192724	fun19p	Ligação ao DNA
jgi,p Gloin1 135750	-2,99257	0,0208774	f-actin-capping protein subunit alpha-2	Organização citoesqueleto
jgi,p Gloin1 82043	-0,737422	0,0212832	5-amp-activated protein kinase subunit beta-2	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 343968	-1,67367	0,0213064	hypothetical protein RirG_120090	-
jgi,p Gloin1 20681	-0,700499	0,0213064	60s acidic ribosomal protein p0	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 184494	-1,15851	0,0216983	mynd domain protein	Crescimento/Desenvolvimento Celular
jgi,p Gloin1 318422	-0,783661	0,0220837	ras other	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 216459	-0,816196	0,0233926	20s proteasome subunit	Organização proteassoma
jgi,p Gloin1 11716	-2,01507	0,0233926	anaphase-promoting complex subunit 1	Crescimento/Desenvolvimento Celular
jgi,p Gloin1 349552	-1,22055	0,0237549	septin spn3	Organização citoesqueleto
jgi,p Gloin1 344160	1,02344	0,0250056	programmed cell death protein 6-like isoform 1	Morte celular
jgi,p Gloin1 339952	-1,0748	0,0250056	40s ribosomal protein s29	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 346022	-1,36073	0,0253464	alpha beta hydrolase	Resposta ao estresse abiótico
jgi,p Gloin1 342179	-1,01879	0,0265736	60s ribosomal protein l18	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 344487	2,55497	0,0275663	glutamine synthetase	Metabolismo de nitrogênio
jgi,p Gloin1 347873	-1,5215	0,0275663	ck1 ck1 ck1-d protein kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 17836	-1,16674	0,0281828	hypothetical protein GLOINDRAFT_17836	-
jgi,p Gloin1 348563	-2,1437	0,0281828	40s ribosomal protein s28	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 145826	-1,30319	0,0284841	g-protein complex alpha subunit	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 343608	-1,1196	0,0286456	mitogen-activated protein kinase	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 22694	-1,1843	0,0286456	carrier protein mitochondrial	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 180637	2,98029	0,0286456	60s ribosomal protein l15	Organização ribossomal

Phytozome ID	Log2foldchange	padj	Função gênica putativa	Classificação Funcional
jgi,p Gloin1 338047	-2,22252	0,0286456	nuclear distribution protein pac1	Crescimento/Desenvolvimento Celular
jgi,p Gloin1 156531	-3,08391	0,0290978	pre-mrna-splicing factor atp-dependent rna helicase prp43	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 346208	-1,13631	0,0294939	negative regulator of the pho system	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 333787	3,5424	0,0294939	ca2+:h+ antiporter	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 340940	-1,17109	0,0299304	t-complex protein 1 subunit zeta	Organização membrana plasmática
jgi,p Gloin1 344138	-1,48195	0,0302	40s ribosomal protein s12	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 40294	1,71106	0,0306254	mitochondrial import translocase subunit tom22	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 347919	-1,22768	0,0309865	hypothetical protein GLOINDRAFT_347984	-
jgi,p Gloin1 340058	-3,42363	0,0309865	hypothetical protein GLOINDRAFT_88971	Ligação a DNA
jgi,p Gloin1 343112	-0,866081	0,03171	gtp-binding protein ryh1	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 347853	1,75798	0,0331993	26s proteasome regulatory subunit n8	Organização proteassoma
jgi,p Gloin1 342979	-2,85946	0,0335898	protein bud31 homolog 2	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 343034	-4,46532	0,0336689	tubulin beta-2 chain-like isoform x2	Organização citoesqueleto
jgi,p Gloin1 348258	-2,01504	0,0349631	tubulin beta-2c chain	Organização citoesqueleto
jgi,p Gloin1 336828	-2,28813	0,035334	ruvb-like 2	Organização cromatina
jgi,p Gloin1 80694	0,860782	0,03615	wd repeat protein pop3	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 324	2,97201	0,0372533	f-actin-capping protein subunit beta isoforms 1 and 2	Organização citoesqueleto
jgi,p Gloin1 73108	5,78471	0,0373578	Protein	-
jgi,p Gloin1 343224	-0,97851	0,0373578	er to golgi transporter yif1	Transporte
jgi,p Gloin1 98105	-2,17964	0,0375552	ras-like protein ral-a	Transdução de sinais
jgi,p Gloin1 350101	-1,43789	0,0376048	heat shock protein hss1	Resposta ao estresse
jgi,p Gloin1 343118	-0,759512	0,0390965	dna damage checkpoint protein rad24	Reparo DNA
jgi,p Gloin1 47840	-1,34512	0,0391358		
jgi,p Gloin1 344913	-0,956494	0,0413113	mixed lineage kinase domain-like protein isoform x1	Proteína quinase
jgi,p Gloin1 341407	1,57348	0,0419025	ribosomal protein l29	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 92179	-4,71568	0,0419444	biotin synthase	Metabolismo de enxofre
jgi,p Gloin1 137084,jgi,p Gloin1 51596	0,807055	0,0419444	dna-binding domain of mlu1-box binding protein mbp1	Ligação a DNA
jgi,p Gloin1 1856	-1,50602	0,0422429	40s ribosomal protein partial	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 338719	-1,47597	0,0433665	major facilitator superfamily	Transporte transmembranar
jgi,p Gloin1 51820	inf	0,0444764	mrna processing-related protein	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 334410	-0,941104	0,0448907	40s ribosomal protein s15	Organização ribossomal
jgi,p Gloin1 198011	1,53791	0,0469275	splicing suppressor of white-apricot homolog	Regulação pós-transcricional
jgi,p Gloin1 346247	-2,82999	0,0474444	hypothetical protein GLOINDRAFT_167280	Crescimento/Desenvolvimento Celular
jgi,p Gloin1 95728	-1,78871	0,0474444	hypothetical protein GLOINDRAFT_346931	Ligação a DNA
jgi,p Gloin1 342445	-1,42618	0,0491638	60s ribosome subunit biogenesis protein nip7	Organização ribossomal

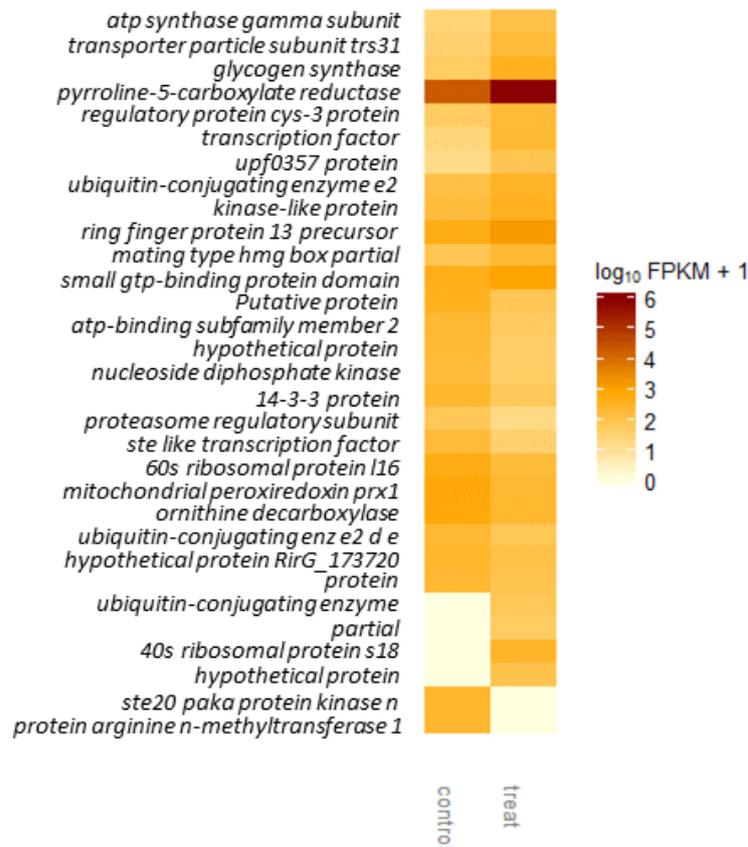


Figura 7.4 – Heatmap com base nos valores de  $\log_{10}$ FPKM para os 31 transcritos que sofreram maior regulação selecionados a partir de um valor q ajustado a  $FRD < 0,01$ . Legenda: Control: plantas inoculadas por FMA irrigadas regularmente; Treat: plantas inoculadas por FMA sob déficit hídrico de 96 h.

Considerando-se os DEGs com maior significância estatística ( $FDR < 0,01$ ), o transcrito *Pyrroline-5-carboxylate reductase* foi o que sofreu maior regulação entre os dois tratamentos, sendo que para *myc+/seca* a indução foi 48,72 vezes em relação ao controle. Este gene coordena para a síntese de uma enzima homônima envolvida na redução de L- $\Delta$ -pyrroline-5-carboxylate (P5C) em L-prolina, um dos mais importantes compostos osmoprotetores cujo acúmulo é sinônimo de resposta ao déficit hídrico em plantas (DE RONDE; SPREETH; CRESS, 2000). Em plantas, prolina é sintetizada a partir de ácido glutâmico e ornitina (ADAMS; FRANK, 1980). O aumento na biossíntese de glutamina indicado pela indução do transcrito *glutamine synthetase* (5,88 vezes) e a repressão de *ornithine decarboxylase* (-3,21 vezes) indicam que este pode ser também um mecanismo de resposta das FMA ao déficit hídrico.

Dentre os 171 DEGs obtidos, cinco transcritos foram detectados em FMA como exclusivamente induzidos sob déficit hídrico: *partial* e *hypothetical protein* (dois transcritos sem caracterização funcional), *40s ribosomal protein s18*, *ubiquitin* e *mrna processing-related protein*. Dois transcritos foram exclusivamente detectados no tratamento controle: *protein arginine n-methyltransferase* (metilação de DNA) e *ste 20 pake protein kinase* (sinalização celular).

A classificação dos DEGs com base nos termos de ontologia gênica extraídos da base de dados do *Gene ontology* indicam um enriquecimento das classes funcionais *Organização ribossomal* (22 DEGs), *Transdução de sinais* (13 DEGs), *Transdução de sinais* (13 DEGs), *Regulação Pós-transcricional* (11 DEGs), *Fator de transcrição* e *Atividade de Peptidase/Organização Proteassoma* (10 DEGs cada) e *Proteína quinase* (9 DEGs) (Figura 8.5). O maior enriquecimento sofrido por estas classes funcionais indica a regulação de vias específicas de sinalização para a regulação da expressão de genes possivelmente associados a resposta das FMA ao déficit hídrico. As classes *Morte celular*, *Crescimento/ Desenvolvimento celular*, *Organização de citoesqueleto* e *Componente celular* totalizam juntas 17 DEGs envolvidos diretamente na regulação do crescimento das hifas de FMA.

A resposta ao déficit hídrico foi caracterizada principalmente pela já citada ativação da biossíntese de prolina, e também pela regulação de proteínas do tipo *Heat shock*. As proteínas *Heat shock* são classificadas como pertencentes ao grupo das chaperonas e são responsáveis pelo dobramento correto de proteínas, translocação e degradação em múltiplos processos celulares, além de estarem também associadas a estabilização de proteínas e membranas, e auxiliarem na alteração estrutural de proteínas durante o estresse (WANG et al., 2004). Dois transcritos associados a proteínas *Heat shock* foram reprimidos no tratamento myc+/seca, *heat shock protein 90-1* (-4,80 vezes) e *heat shock protein hss1* (-2,71 vezes).

Uma expressiva regulação de transcritos associados ao controle da expressão gênica foi evidenciada. Um total de dez fatores de transcrição foram diferencialmente expressos em myc+/seca, sendo que cinco deles foram induzidos: *putative transcription factor* (9,85 vezes); *regulatory protein cys-3* (3,80 vezes); *HLH DNA binding protein* (2,69 vezes); *NAC protein* (36,86 vezes); *ph-response transcription factor pacc rim 101* (11,68 vezes). Outros cinco foram reprimidos: *ste like transcription factor* (-5,39 vezes); *tata-box-binding protein* (-7,37 vezes); *c2h2 zinc finger protein* (-2,18 vezes); *transcription factor dp* (-2,76 vezes); e *eucaryotic translation initiation factor suit1* (-1,60 vezes). Entre os mecanismos de regulação pós-transcricional o transcrito *mrna processing-related protein* foi somente expresso no tratamento myc+/seca e *nop10p-domain-containing protein* no tratamento myc+/ctrl.

Além disso, um supressor de *splicing* foi induzido, *splicing supressor of white-apicot homolog* (2,90 vezes), *rna-binding protein rsd1* (-2,22 vezes), *glycine-rich RNA binding protein* (-19,71), *pre-mRNA-splicing factor atp-dependent RNA helicase prp43* (-8,48 vezes).

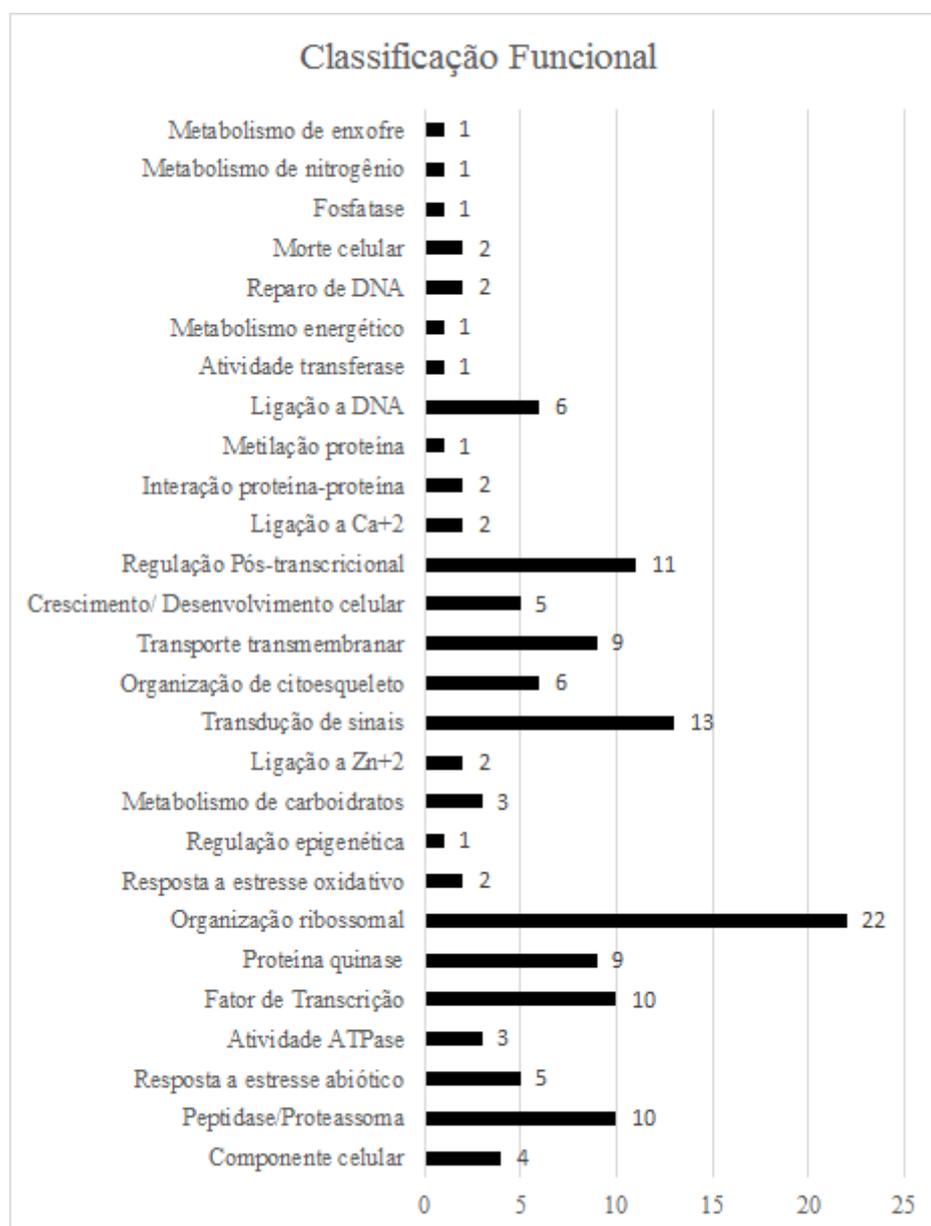


Figura 7.5 – Classificação funcional dos 171 DEGs com base nos termos de ontologia gênica de Gene Ontology. O número de DEGs agrupados em cada classe encontram-se destacados.

O transcrito *glycogen synthase*, associado a biossíntese do polissacarídeo de reserva glicogênio, sofreu indução de 5,88 vezes para o tratamento *myc+/seca*. O acúmulo de glicogênio é induzido por uma variedade de processos que geram estresse celular, como por exemplo a redução na disponibilidade de nutrientes essenciais ou excesso de calor

(NI; LaPORTE, 1995). Células exibindo um alto nível de divisão e crescimento celular apresentam baixas concentrações de glicogênio, enquanto células que se aproximam do estágio estacionário de desenvolvimento acumulam grandes quantidades desse composto. De fato, dos onze DEGs relacionados a crescimento/ desenvolvimento celular e organização do citoesqueleto, dez deles foram reprimidos no tratamento myc+/seca: *actin-related protein* (-4,19 vezes), *peanut-like protein 1* (-4,38 vezes), *mynd domain protein* (-2,23 vezes), *anaphase-promoting complex* (-4,04 vezes), *nuclear distribution protein pac1* (-4,67 vezes), *hypothetical protein Gloindraft\_167280* (-7,11 vezes), *tubulin beta-2a chain* (-4,04 vezes), *tubulin beta-2 chain like isoform x2* (-22,10 vezes), *septin spn3* (-2,33 vezes) e *f-actin-capping protein subunit alpha-2* (-7,94 vezes).

#### 7.4 Conclusões

Embora importantes avanços tenham sido alcançados nos últimos anos no sentido de se elucidar os mecanismos pelos quais FMA modulam a expressão gênica em plantas, condicionando para padrões específicos de resposta a estímulos ambientais, pouco ainda se sabe sobre o impacto dessas fontes de estresse, ou mesmo da interação simbiótica, sobre os perfis de expressão gênica dos fungos. A análise transcriptômica descrita nesse trabalho oferece um novo e bastante interessante conjunto de genes candidatos associados à resposta de FMA ao estresse, com forte potencial para o desenvolvimento de marcadores moleculares para a seleção de inóculos eficientes para a aplicação em culturas agrícolas com o objetivo de melhorar o desempenho durante a ocorrência de eventos de seca.

#### Referências

- ADAMS, E.; FRANK, L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p. 1005-1061, 1980.
- ANGELARD, C.; COLARD, A.; NICULITA-HIRZEL, H.; CROLL, D.; SANDERS, I. R. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. **Current Biology**, Cambridge, v. 20, n. 13, p. 1216–1221, 2010.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

CROLL, D.; SANDERS, I. R. Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 9, p. 13, 2009.

DE RONDE, J. A.; SPREETH, M. H.; CRESS, W. A. Effect of antisense L- $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 13–26, 2000.

GAUDE, N.; BORTFELD, S.; DUENSING, N.; LOHSE, M.; KRAJINSKI, F. Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. **Plant Journal**, Chichester, v. 69, n. 3, p. 510–528, 2012.

GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, London, v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GOMEZ, S. K.; JAVOT, H.; DEEWATTHANAWONG, P.; TORRES-JEREZ, I.; TANG, Y.; BLANCAFLOR, E. B.; UDVARDI, M. K.; HARRISON, M. J. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 10, 2009.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, London, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

HIJRI, M.; SANDERS, I. R. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. **Nature**, London, v. 433, p. 160–163, 2005.

NI, H.-T.; LaPORTE, D. C. Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 1197–1205, 1995.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, DC, v. 289, n. 5486, p. 1920–1921, 2000.

REDECKER, D.; RAAB, P. Phylogeny of the glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. **Mycologia**, Lancaster, v. 98, n. 6, p. 885–895, 2006.

REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 91, n. 25, p. 11841–11843, 1994.

SANDERS, I. R. Evolutionary genetics. No sex please, we're fungi. **Nature**, London, v. 399, n. 6738, p. 737–739, 1999.

SANDERS, I. R.; CROLL, D. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 44, p. 271–292, 2010.

TISSERANT, E.; KOHLER, A.; DOZOLME-SEDDAS, P.; BALESTRINI, R.; BENABDELLAH, K.; COLARD, A.; CROLL, D.; DA SILVA, C.; GOMEZ, S.K.; KOUL, R.; FERROL, N.; FIORILLI, V.; FORMEY, D.; FRANKEN, P.; HELBER, N.; HIJRI, M.; LANFRANCO, L.; LINDQUIST, E.; LIU, Y.; MALBREIL, M.; MORIN, E.; POULAIN, J.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; WASCHKE, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; HARRISON, M.J.; KÜSTER, H.; LAMMERS, P.; PASZKOWSKI, U.; REQUENA, N.; RENSING, S.A.; ROUX, C.; SANDERS, I.R.; SHACHAR-HILL, Y.; TUSKAN, G.; YOUNG, J.P.W.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTIN, F. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. **New Phytologist**, Oxford, v. 193, n. 3, p. 755–769, 2012.

TISSERANT, E.; MALBREIL, M.; KUO, A.; KOHLER, A.; SYMEONIDI, A.; BALESTRINI, R.; CHARRON, P.; DUENSING, N.; FREI DIT FREY, N.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GILBERT, L.B.; HANDA, Y.; HERR, J.R.; HIJRI, M.; KOUL, R.; KAWAGUCHI, M.; KRAJINSKI, F.; LAMMERS, P.J.; MASCLAUX, F.G.; MURAT, C.; MORIN, E.; NDIKUMANA, S.; PAGNI, M.; PETITPIERRE, D.; REQUENA, N.; ROSIKIEWICZ, P.; RILEY, R.; SAITO, K.; SAN CLEMENTE, H.; SHAPIRO, H.; VAN TUINEN, D.; BÉCARD, G.; BONFANTE, P.; PASZKOWSKI, U.; SHACHAR-HILL, Y.Y.; TUSKAN, G.A.; YOUNG, J.P.W.; YOUNG, P.W.; SANDERS, I.R.; HENRISSAT, B.; RENSING, S.A.; GRIGORIEV, I.V.; CORRADI, N.; ROUX, C.; MARTIN, F. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 110, n. 50, p. 20117–22, 2013.

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. a; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 5, p. 511–515, 2010.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 244–52, 2004.

## 8. Conclusões Gerais

O modelo de interação plantas-FMA adotado nesse trabalho - feijoeiro BAT 477 colonizado por uma mistura de FMA (*G. clarum*, *A. scrobiculata* e *G. rosea*) - demonstrou ser eficiente para confirmar nossa hipótese inicial de que a regulação das relações hídricas da planta durante a seca está em parte associada a uma regulação nos perfis de expressão de genes relacionados à resposta da planta ao déficit hídrico. Comparando-se os perfis de expressão gênica de BAT 477, inoculados e não-inoculados com FMA, submetidos a um regime de 96 h de déficit hídrico, fomos capazes de isolar 71 transcritos diferencialmente expressos como regulados pelo fator micorrização. A comparação entre os tratamentos estresse e controle revelaram um conjunto muito similar de transcritos, sendo 12.086 genes para inoculado e 11.938 genes para não inoculado. Estes resultados refletem um alto potencial de tolerância da linhagem BAT 477 e indicam que a presença de FMA produz uma regulação fina no perfil de expressão de genes usualmente envolvidos na resposta da planta ao estresse. A análise temporal obtida comparando-se o perfil de expressão de fatores de transcrição responsivos ao déficit hídrico em três períodos distintos de indução do estresse indicam que plantas inoculadas ativaram a expressão destes genes mais tardiamente (após 72 h), refletindo melhorias nas condições hídricas da planta que adiam a percepção ao estresse. Adicionalmente, a expressão de 23 transcritos foi avaliada em três amostras teciduais diferentes obtidas por microscopia de microdissecação a laser. *Glucan 1,3  $\beta$ -Glucosidase* e *PIP2,3*, foram detectados somente em células do córtex radicular contendo arbúsculos indicando uma possível indução tecido específica dependente da presença dos fungos e seis genes sofreram forte indução durante a simbiose. A avaliação de parâmetros fisiológicos e de crescimento de outros cinco genótipos de feijoeiro contrastantes em relação à tolerância à seca e colonizados pela mesma mistura de FMA apontam que linhagens com históricos distintos de melhoramento genético se beneficiam da simbiose através de mecanismos distintos, sendo que de todos os parâmetros analisados, a linhagem tolerante SEA-5, apesar de apresentar uma das menores taxas de colonização registradas, foi a que mais se beneficiou dos efeitos benéficos da interação. Análises complementares de bioinformática apontam que os parceiros fungos também alteram seu perfil transcricional durante a simbiose e a seca, sendo que nossas análises de RNA-Seq apontam para a regulação de 171 transcritos durante a aplicação dos tratamentos. Em conjunto, fomos capazes de gerar um excelente banco de dados relacionados a resposta do feijoeiro e das FMA ao déficit hídrico, apontando futuros genes candidatos a serem empregados não somente na seleção de genótipos de feijoeiro mais tolerantes, mas também de raças de FMA a serem empregadas em práticas agrícolas visando uma maior produtividade em áreas sujeitas a eventos de seca.

**ANEXOS**

**Anexo A – Arquivos suplementares do Capítulo 1.**

**Tabela Suplementar A.1** – Formulação das Soluções de *Hoagland e Arnon* (Sarruge, 1975): 1. com deficiência de fósforo (para tratamentos contendo FMA). 2. Completa (Para tratamentos sem FMA).

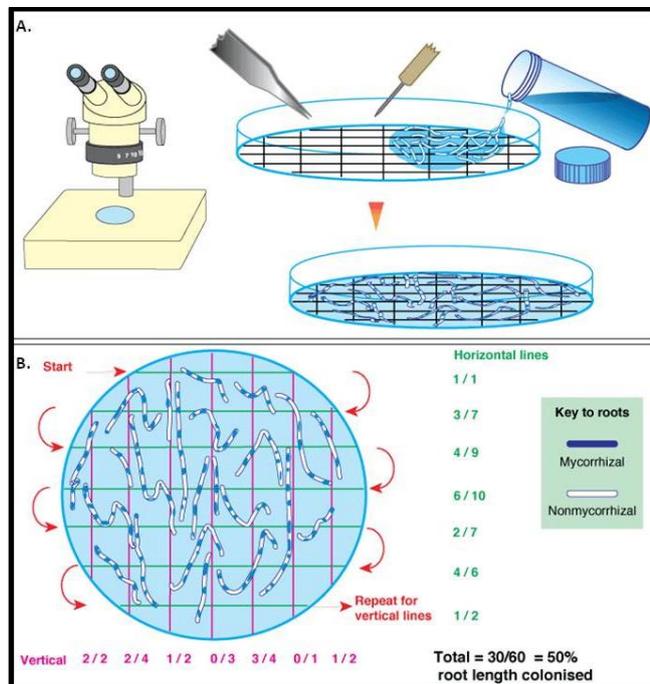
<b>Soluções Estoques <sup>1</sup></b>	<b>Concentração Mol/L</b>	<b>Volume ml/10L</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25	12*
KCl	1	7**
KNO <sub>3</sub>	1	50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	50
MgSO <sub>4</sub>	1	20
Micronutrientes		10
Fe-EDTA		10
<b>Soluções Estoques <sup>2</sup></b>	<b>Concentração Mol/L</b>	<b>Volume ml/10L</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25	40
KNO <sub>3</sub>	1	50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	50
MgSO <sub>4</sub>	1	20
Micronutrientes		10
Fe-EDTA		10
<b>Micronutrientes</b>	<b>g/L</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08	
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,02	

\*0,3X o volume normal de fósforo

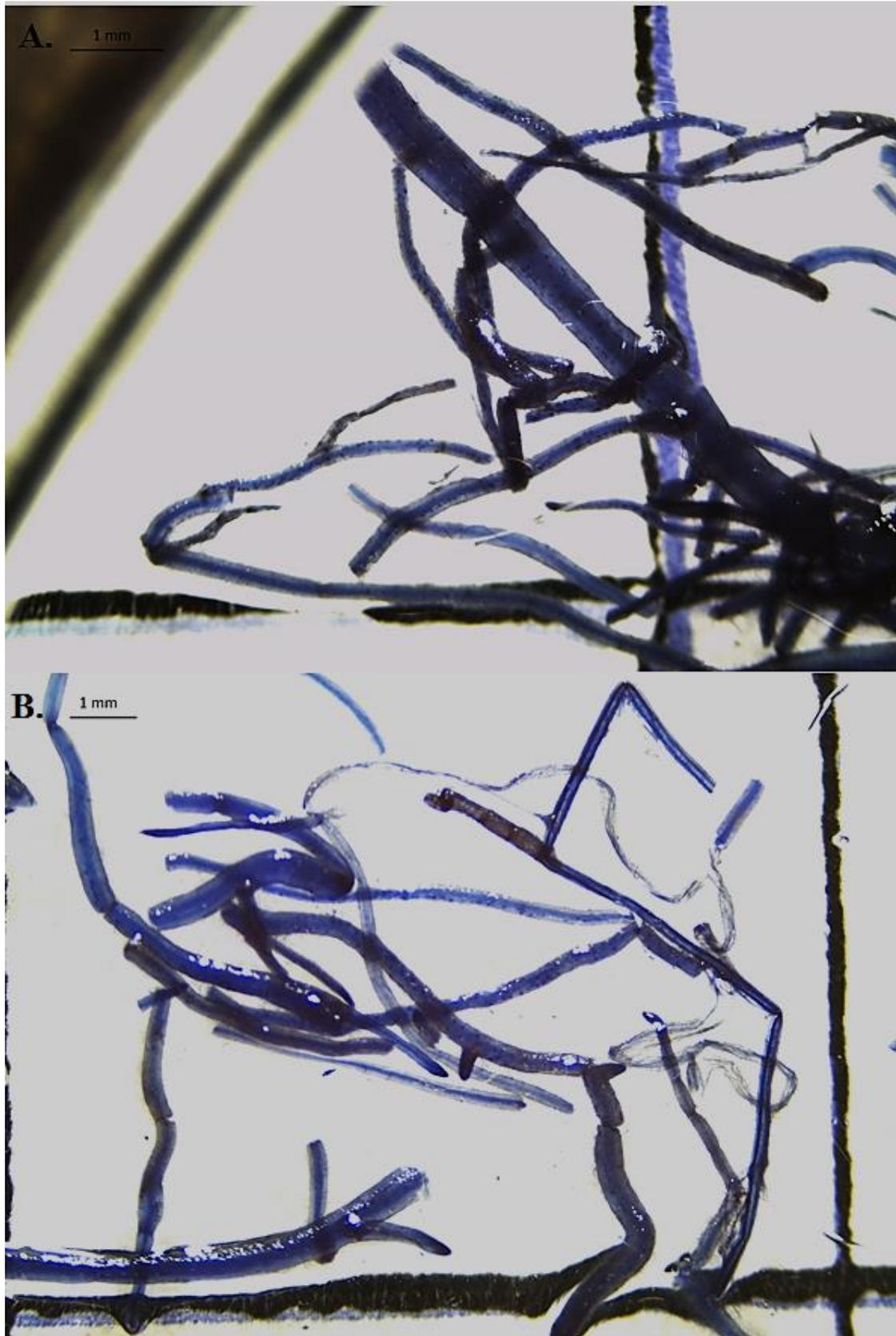
\*\* Completa com KCl para a quantidade completar final de potássio.



**Figura Suplementar A.1** – Desenho esquemático de cultivo armadilha adotado para manutenção das culturas de FMA utilizadas nos experimentos em casa de vegetação (Adaptado de Novais 2009, < [http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma\\_metodos\\_cultivo\\_armadilha.html](http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fma_metodos_cultivo_armadilha.html)>). Em nosso laboratório a gramínea *Brachiaria ruziziensis* submetida a escarificação ácida em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por 15 min.

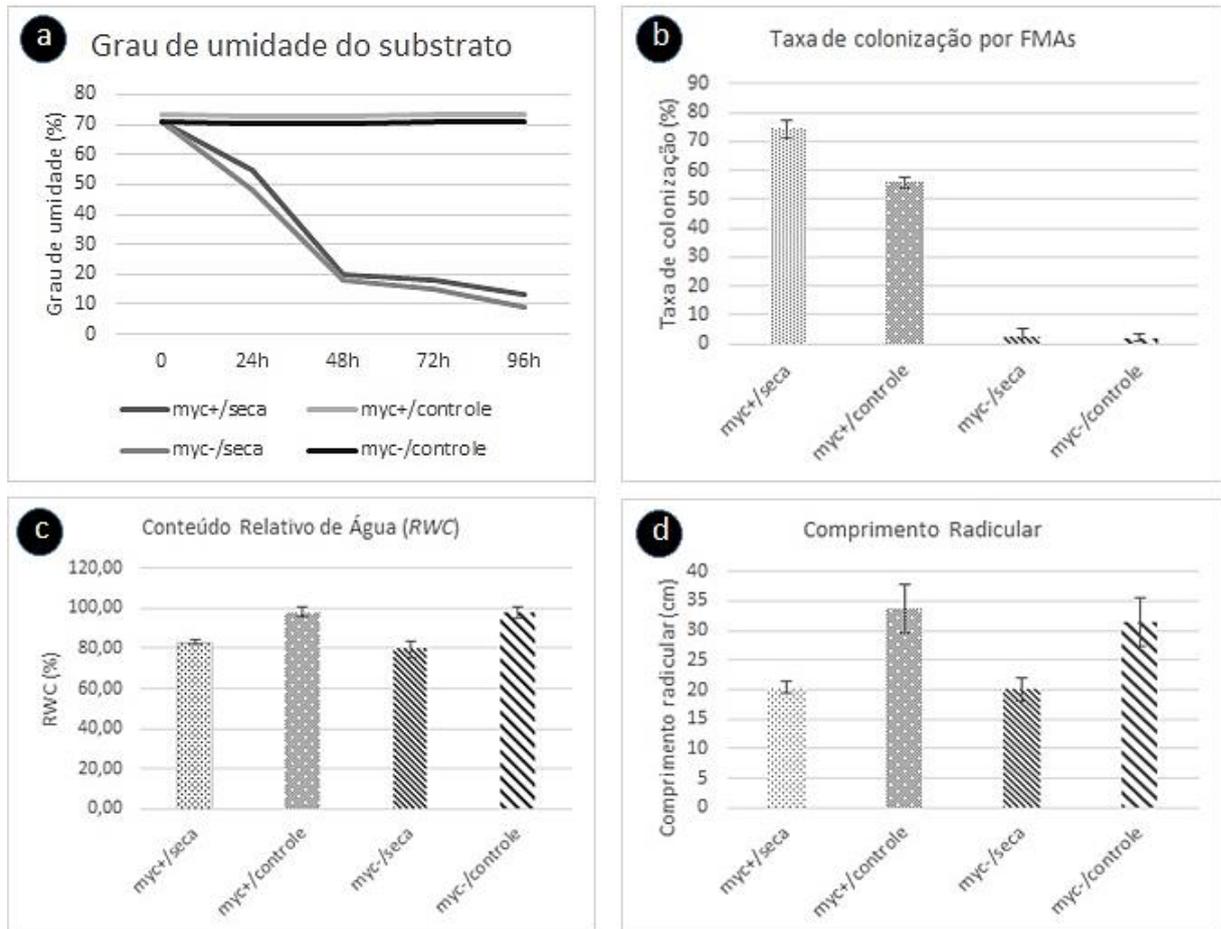


**Figura Suplementar A.2** - Coloração das raízes para estimativa da taxa (%) de colonização por FMA. A. Distribuição do material corado sobre malha quadriculada em placa de Petri para contagem das colônias. B. Método de contagem das colônias.

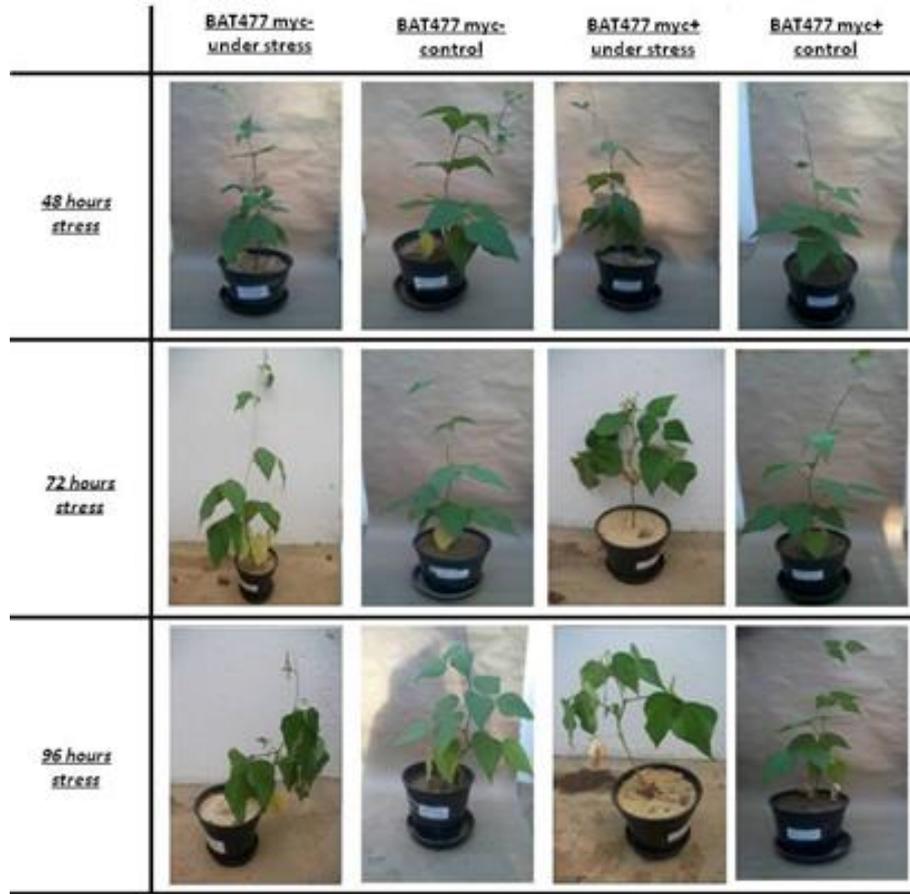


**Figura Suplementar A.3** – Contagem dos pontos de colonização em segmentos radiculares de feijoeiro inoculados com FMA. A. BAT 477 myc+/seca; B. BAT 477 myc+/ctrl.

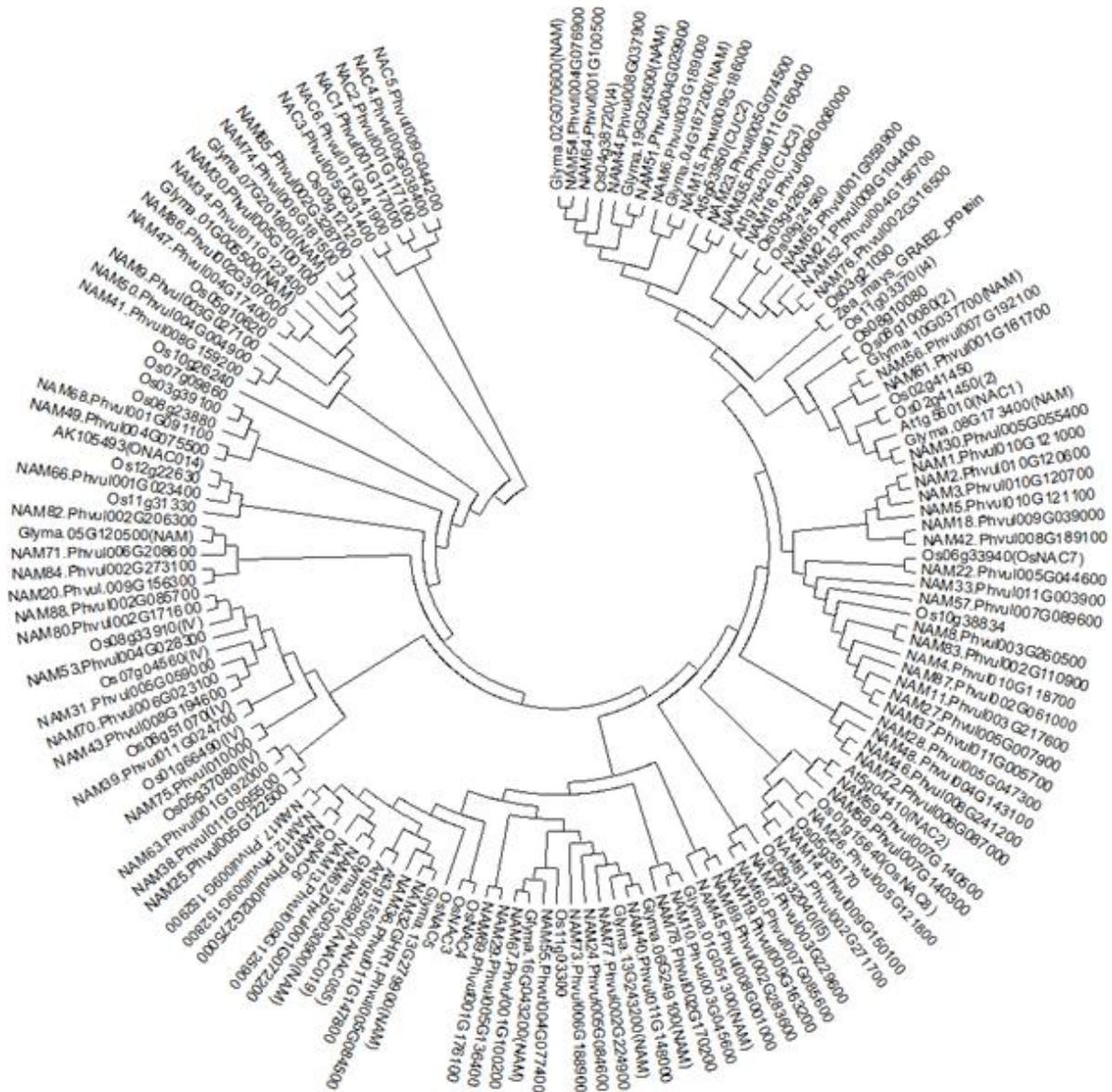
## Anexo B – Arquivos suplementares do Capítulo 2.



**Figura Suplementar B.1** – Parâmetro utilizados para a validação dos ensaios de déficit hídrico em casa de vegetação. a. Grau de umidade do substrato (%) ao longo do período dos tratamentos; b. Taxa de colonização das raízes de BAT 477 por FMA (*Glomus clarum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora rosea*) expostas a 96 horas de tratamento; c. conteúdo relativo de água – RWC (%) das plantas após 96 horas de tratamento; d. comprimento radicular (cm) das plantas após 96 horas de tratamento.



**Figura Suplementar B.2** – Quadro esquemático do aspecto fenotípico das plantas antes das coletas. Myc + - plantas inoculadas com mistura de FMA; Myc - - controle não inoculado.



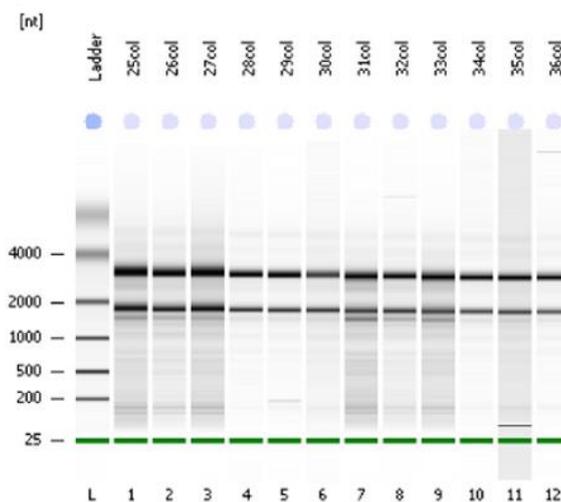
**Figura Suplementar B.3** – Análise filogenética de genes pertencentes a família NAC em feijoeiro (*P. vulgaris* L.) obtida pelo método de *Neighbor-joining* e em outras três espécies de plantas usadas como referência, *O. sativa*, *A. thaliana* e *G. max*, obtida pelo método de *Neighbor-joining*.

### Anexo C – Arquivos suplementares aos Capítulos 3 e 5.

**Tabela Suplementar C.1** - RIN number e quantidade de RNA total em ng/ $\mu$ L para cada uma das amostras analisadas pelo sistema o sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Amostras	RIN	ng/ $\mu$ L
25	7.1	492
26	7.5	375
27	7.2	648
28	9.1	89
29	8.9	101
30	8	43
31	7.3	202
32	7.7	94
33	7.5	423
34	9.1	44
35	9.1	39
36	9.1	52

Electrophoresis File Run Summary



**Figura Suplementar C.1** - Eletroferograma das amostras de RNA-total utilizadas para RNA-Seq. A qualidade e integridade das amostras foi atestada comparando-se o perfil de bandas bem definidas das duas subunidades de rRNA (28S e 18S) em relação àum padrão interno (ladder). Da esquerda para a direita: amostras 25, 26 e 27 myc+/seca; 28, 29 e 30 myc+/controle; 31, 32 e 33 -myc/seca; 34, 35 e 36 -myc/controle. Myc+: inoculado com FMA; Myc-: não inoculado.

**Tabela Suplementar C.2** – Estatísticas gerais das análises de RNA-Seq.

<b>Amostras</b>	<b>Número de reads</b>	<b>Reads trimados</b>	<b>Reads trimados (%)</b>	<b>Tamanho Sequência (pb)</b>	<b>Conteúdo GC (%)</b>	<b>Phred value</b>	<b>Conteúdo de N</b>
<b>1. Myc+/strss</b>	31284240	23770158	75,98	101	43	36	-
<b>2. Myc+/strss</b>	34452836	26222938	76,11	101	48	36	-
<b>3. Myc+/strss</b>	19782054	14841590	75,03	101	44	36	-
<b>1. Myc+/ctrl</b>	4738430	3626510	76,53	101	44	36	-
<b>2. Myc+/ctrl</b>	30372382	23215684	76,44	101	45	36	-
<b>3. Myc+/ctrl</b>	31026156	23725634	76,47	101	44	36	-
<b>1. Myc-/strss</b>	29299330	22216830	75,83	101	49	36	-
<b>2. Myc-/strss</b>	29932872	22736462	75,96	101	46	36	-
<b>3. Myc-/strss</b>	31081148	23040910	74,13	101	45	36	-
<b>1. Myc-/ctrl</b>	26648556	20056326	75,26	101	45	36	-
<b>2. Myc-/ctrl</b>	28891988	21781980	75,39	101	46	36	-
<b>3. Myc-/ctrl</b>	24909752	18904632	75,89	101	46	36	-