

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA COMUNIDADE MICROBIANA
DA RIZOSFERA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATEIRO
SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR**

CARLOS MOACIR COLODETE

VILA VELHA
MARÇO / 2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA COMUNIDADE MICROBIANA
DA RIZOSFERA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATEIRO
SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

CARLOS MOACIR COLODETE

VILA VELHA
MARÇO / 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C718a Colodete, Carlos Moacir.

Alterações bioquímicas e da comunidade microbiana da rizosfera de plantas transgênicas de tomateiro super-expressando a H⁺-PPase Vacuolar / Carlos Moacir Colodete – 2013.

57 f. : il.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Tomates – Melhoramento genético. 2. Rizosfera. 3. Micorriza. I. Ramos, Alessandro Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 581.35

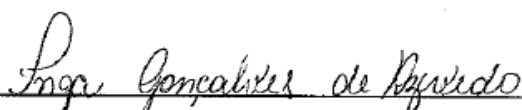
CARLOS MOACIR COLODETE

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E DA COMUNIDADE MICROBIANA
DA RIZOSFERA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TOMATEIRO
SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR**

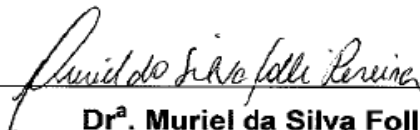
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 23 de Março de 2013,


Banca Examinadora:



Dr^a. Inga Gonçalves de Azevedo - UENF



Dr^a. Muriel da Silva Folli Pereira - UVV



Dr. Leonardo Barros Dobbss – UVV



Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UVV

Orientador

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Moacir (†) e Leir,

À minha esposa Thamara,

À tia Neide,

À sogra Gilce.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades colocadas em minha vida e por me fazer tão forte nos momentos difíceis, além de me presentear com pessoas maravilhosas.

Aos meus pais Moacir Colodete (†) e Leir de Lemos Colodete, pelo carinho e por me colocar em suas orações.

Ao meu grande amor Thamara Pianissola Rossi Colodete, mesmo nas minhas ausências, sempre companheira de todas as horas, por toda a confiança e orgulho em mim depositados. Muito obrigado princesa!

À tia Neide Rossi Nicoli, por ser este anjo, pelo pleno amor, incentivo e exemplo pessoal e profissional em minha vida, pelos momentos de alegria e descontração, por me colocar em suas orações, torcer para que eu atinja meus objetivos e acima de tudo, pela presença quando mais precisei.

À tia Gilce Helena Pianissola Rossi, pelo pleno amor, confiança, amizade, respeito ao meu trabalho, por me colocar em suas orações e torcer para que eu atinja meus objetivos.

Ao orientador professor Dr. Alessandro Coutinho Ramos, pelos valiosos ensinamentos, orientação, revisões deste trabalho, apoio, motivação, amizade e acima de tudo, por ser este “divisor de águas” em minha vida acadêmica. Muito obrigado por tudo!

Ao grande parceiro Sávio Bastos de Souza, pela amizade, empenho e incondicional ajuda durante todos os experimentos. Muito obrigado por tudo!

À Juliana Melo e Gabriela Canton, pelas dicas, *papers* e auxílio nas análises microbiológicas.

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB), pelo apoio à pesquisa e por disponibilizar a estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Aos integrantes do laboratório (LMAB): Sávio Bastos, Juliana Melo, Gabriela Canton, Wolman Santos, Maísa Duarte, Frederico Eutrópio, Romildo Azevedo, Thécio Cassaro, Romulo Boldrini, Muriel da Silva, Umberto Zottich e estagiários. Obrigado!

Aos professores: Prof. Dr. James Joseph Roper, Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss, Prof. Dr. Marcelo da Silva Moretti, Prof. Dr. Charles Gladstone Duca Soares, Prof. Dr. Marco Antonio Oliva Cano, Prof. Dr. Paulo Dias Ferreira Júnior,

Prof. Dr. Werther Krohling e Prof^a. Dr^a Zilma Maria de Almeida Cruz, pelo incentivo à pesquisa.

Ao Dr. Sidney Luiz Stürmer (Departamento de Ciências Naturais - Universidade Regional de Blumenau – Blumenau /SC) e a Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG), por ter concedido gentilmente o inóculo *Scutellospora heterogama* PNB 102 A.

Ao Dr. Roberto Gaxiola (Arizona State University – EUA) por ceder as sementes para a realização deste experimento.

Ao *Bank Exchange of Glomales* (BEG, Dijon - França) por ter concedido o inóculo *Glomus intraradices* BEG 24.

Ao SINDIUPES (Sindicato dos Trabalhadores em Educação Pública do Espírito Santo), pela concessão do alojamento (Vitória-ES).

À Universidade Vila Velha (UVV) pela concessão da bolsa AP, no Mestrado em Ecologia de Ecossistemas.

Aos colegas de sala no mestrado, pela força, persistência, luta e amizade.

Ao Rodolpho Waichert, pela grande parceria, amizade e incentivo em sala de aula.

Aos Diretores das Escolas: Cássia Suyan (EEEFM Domingos Ubaldo) e Márcio Damartini (EEEFM Hosana Salles) pela compreensão, carinho, amizade e apoio recebido. Muito obrigado!

À Coordenadora (EEEFM Domingos Ubaldo) Maria Osília, pela amizade, alegria e apoio recebido. Muito obrigado!

À tia Isabel Colodetti, pelo apoio e incentivo à educação e união familiar.

Ao amigo Maykon Zanetti, pelas dicas e auxílios nos *layouts* da (Figura 11) e (Figura12) do artigo científico.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO..... | 01 |
| ABSTRACT..... | 02 |
| FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA: Alterações na exsudação de fitoquímicos em plantas transgênicas e da comunidade microbiana da rizosfera colonizadas com micorrizas arbusculares..... | 03 |
| CONCLUSÕES..... | 14 |
| REFERÊNCIAS | 15 |
| | |
| ARTIGO: Alterações bioquímicas e da comunidade microbiana da rizosfera de plantas transgênicas de tomateiro super-expressando a H ⁺ -PPase vacuolar..... | 21 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 24 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 30 |
| 4. CONCLUSÕES..... | 47 |
| 5. AGRADECIMENTOS | 48 |
| 6. REFERÊNCIAS | 49 |

Resumo

COLODETE, Carlos Moacir, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, março de 2013. **Alterações bioquímicas e da comunidade microbiana da rizosfera de plantas transgênicas de tomateiro super-expressando a H⁺-PPase vacuolar.** Orientador: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

No presente trabalho, avaliou-se a colonização micorrízica inoculados por *Glomus intraradices* e atividades enzimáticas de estresses oxidativos em raízes transgênicas de tomateiro (*AVPIOX*) e silvestre (Wt), inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (*G.intraradices* e *Scutellospora heterogama*). Para estas avaliações, utilizou-se um arranjo fatorial 2x3x1, (*AVPIOX*-Wt/Controle-*S.heterogama*-*G.intraradices*/70 dias após inoculação (d.a.i.)), com cinco repetições. Para avaliação da alteração microbiana na rizosfera de *AVPIOX*, utilizou-se um arranjo fatorial 2x2x1, (*AVPIOX*-Wt/Controle-*S.heterogama*/70 d.a.i.), com cinco repetições, através de rizotubos. Os resultados revelaram que a inoculação micorrízica em raízes de *AVPIOX* com *G.intraradices*, induziram aumentos significativos de 17% na colonização micorrízica em comparação com Wt e claras evidências de alongamento celular. Além disso, comportamentos não usuais como o engrossamento das hifas e presença de arbúsculos abortados foram observados em *AVPIOX*, indicando envolvimento nos mecanismos de defesa de natureza genética, bioquímica, física e fisiológica. Nas atividades enzimáticas, *AVPIOX* inoculados ou não, apresentaram reduções da CAT, evidenciando menor mecanismo de defesa. *AVPIOX* inoculados com *G.intraradices* obtiveram reduções significativas da CAT em 48,25% e inversamente proporcional, mas em menor grandeza em 31,75% quando inoculados com *S.heterogama*. Para AcP, Wt inoculados com *G.intraradices* e *S.heterogama* obtiveram aumentos significativos de 61% e 88% respectivamente, em relação aos seus controles. Por outro lado, *AVPIOX* inoculados por *G.intraradices* revelaram reduções da AcP em 36%, mas de forma inversa, quando inoculados por *S.heterogama* em 25%. *S.heterogama* foi o inóculo que mais favoreceu as atividades de defesas oxidativas em *AVPIOX*, revelando seu caráter biorregulador. A AIP em *AVPIOX* inoculados com *G.intraradices* obtiveram aumentos significativos de 272%. Similarmente, mas em menor grandeza, ocorreu com *S.heterogama* com 189%. Estes resultados corroboram com o mecanismo proposto para a atividade da AIP, sendo o mesmo considerado bom indicador de colonização micorrízica. Descobrimos que no solo rizosférico, *AVPIOX* favorecem mais a densidade total de fungos que bactérias e as mesmas quando inoculadas, responderam de forma invertida.

Palavras-chave: colonização micorrízica, CAT, AcP, AIP, *AVPIOX*

Abstract

COLODETE, Carlos Moacir, M.Sc., University Vila Velha - ES, March 2013. **Changes of biochemical and microbial community in rhizosphere of transgenic plants tomato super-expressing vacuolar H⁺-PPase.** Advisor: Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

In this study, we evaluated the inoculated mycorrhizal colonization by *Glomus intraradices* and enzymatic activities of oxidative stress in transgenic tomato roots (*AVP10X*) and wild (Wt) or not inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (*G.intraradices* and *Scutellospora heterogama*). For these evaluations, we used a 2x3x1 factorial arrangement, (*AVP10X*-Wt/Controle-*S.heterogama*-*G.intraradices*/70 days after inoculation (d.a.i.)), with five replicates. To evaluate the changes in the rhizosphere microbial *AVP10X*, used a 2x2x1 factorial arrangement, (*AVP10X*-Wt/Controle-*S.heterogama*/70 d.a.i.), with five replicates through rizotubos. The results showed that inoculation with mycorrhizal roots with *AVP10X* *G.intraradices*, induced significant increases of 17% in colonization compared to Wt and clear evidence of cell elongation. Furthermore, unusual behavior as thickening of the presence of hyphae and arbuscules aborted *AVP10X* were observed, indicating involvement in the defense mechanisms of genetic nature, biochemical, physiological and physical. Enzymatic activities, *AVP10X* inoculated or not, showed reductions of CAT, showing a decreased defense mechanism. *AVP10X* inoculated with *G.intraradices* obtained significant reductions in CAT 48.25% and inversely proportional, but in smaller quantity in 31.75% when inoculated with *S.heterogama*. For AcP, Wt inoculated with *G.intraradices* and *S.heterogama* significant increases of 61% and 88% respectively, compared to their controls. Moreover, *AVP10X* inoculated by *G.intraradices* showed reductions of AcP in 36%, but in reverse, when inoculated *S.heterogama* 25%. *S.heterogama* the inoculum was the most favored activities oxidative defenses in *AVP10X*, revealing his character bioregulator. AIP in *AVP10X* inoculated with *G.intraradices* significant increases of 272%. Similarly, but to a lesser magnitude, occurred with *S.heterogama* with 189%. These results support the proposed mechanism for the activity of AIP, being even considered good indicator of mycorrhizal colonization. We found that the rhizosphere, *AVP10X* favor over the total density of bacteria and fungi that the same when challenged, responded reversed.

Key words: mycorrhizal colonization, CAT, AcP, AIP, *AVP10X*

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Alterações na exsudação de fitoquímicos em plantas transgênicas e da comunidade microbiana da rizosfera colonizadas com micorrizas arbusculares*

Carlos Moacir Colodete¹ & Alessandro Coutinho Ramos¹✉

¹Universidade Vila Velha-UVV. Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LMAB). Rua Comissário José Dantas de Melo 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, Brasil.

✉Endereço para correspondência: alessandro.ramos@uvv.br

*Manuscrito apresentado nas normas da revista *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*

1. Biotecnologia e energética da interação MA

A perspectiva de crescimento populacional para os próximos anos possibilita antever que a demanda por alimentos será cada vez maior. Para produzir alimentos em quantidade que atendam a população, o melhoramento genético das plantas tem papel fundamental. Segundo Ahmad *et al.*, 2011, um aumento de 94 vezes na área plantada de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 160 milhões de hectares em 2011, torna as culturas GM, as mais adotadas na história da agricultura moderna.

Com a tecnologia do DNA recombinante através do desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGMs), torna-se possível incrementar a dinâmica das pesquisas científicas e que vem tornando uma poderosa ferramenta na obtenção de conhecimentos mais detalhados sobre os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de plantas e das interações planta-microrganismos (Gaxiola *et al.*, 2005; 2007; 2011; 2012; 2013).

Nesse contexto, a superexpressão da H⁺-pirofosfatase (H⁺-PPase), gene *AVPIOX*, em *Arabidopsis thaliana* resultaram na homeostase iônica, aumento das divisões celulares, hiperplasia (aumento do número celular), crescimento vegetal via um maior desenvolvimento radicular, maior absorção de água e nutrientes, elevação da auxina com consequente alongamento celular, maior atividade da H⁺-ATPase e tolerância ao estresse salino (Gaxiola *et al.*, 2007; 2011; 2012; 2013).

Segundo Gaxiola *et al.*, (2007), mudanças na expressão do *AVPIOX* afetaram a abundância e a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática, alterando o pH do apoplasto e o transporte de auxina em plantas. Testes moleculares, bioquímicos e fisiológicos realizados com *A.thaliana* demonstraram um aumento na tolerância à salinidade devido a maior absorção e acumulação de íons Na⁺ em seus vacúolos e consequentemente uma elevação na capacidade osmorregulatória. Sendo assim, *AVPIOX* revelaram uma habilidade em resistir a diferentes condições de estresses.

Anteriormente, Park *et al.*, (2005) realizaram pesquisas sobre a superexpressão da H⁺-PPase vacuolar em raiz de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) *AVPIOX*. Estes estudos bioquímicos e de transporte, confirmaram a expressão funcional desta proteína recombinante na linhagem dos tomateiros GM. Determinações da atividade hidrolítica da H⁺-PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens representativas *XAVPID* e plantas controles, mostraram que as plantas GM obtiverem em média 56% de aumento de sua atividade em relação as plantas controles, enquanto a H⁺-ATPase vacuolar, não sofreram modificações significativas. Quando submetidas ao estresse hídrico, *AVPIOX* demonstraram rápida recuperação após reidratação, ou seja, após interrupção do estresse.

Ramos *et al.*, (2005) realizaram estudos associando a atividade de H⁺-ATPases da membrana plasmática e vacuolar e também da H⁺-PPase vacuolar em plantas de milho (*Zea mays* L.) inoculadas com dois FMAs (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*). Estes autores observaram que nas raízes de milho colonizadas pelos FMAs apresentavam significativos incrementos na nutrição mineral e na atividade das H⁺-ATPases na fase de estabelecimento da interação. Por outro lado, foi relatado que a atividade da H⁺-PPase vacuolar foi fortemente estimulada nas fases iniciais da simbiose. Sendo assim, pode ser feita uma analogia entre micorrização e *AVP1OX* (super-expressando a H⁺-PPase vacuolar), pois ambas promovem efeitos semelhantes nos indivíduos. Dados moleculares demonstraram anteriormente a mesma capacidade do FMAs em induzir o aumento da expressão do gene H⁺-ATPase da membrana plasmática da planta hospedeira, tal como acontece com *AVP1OX* (Ferrol *et al.*, 2002).

2. Impacto das PGMs sobre a colonização micorrízica:

Alterações e reduções na colonização micorrízica radicular inoculados com FMAs em algumas PGMs foram observadas (Tabela 1).

Powell *et al.*, (2007) demonstraram que em quatro variedades de soja *Glycine max* - *CP4-EPSPS* (2602R, 2702R, AG1901 e DKB06-52) obtiveram efeitos significativos sobre a colonização micorrízica nas raízes de soja, no entanto, em nenhum caso a variação foi significativamente associada com a modificação genética. Além disso, foram realizados experimentos com tabaco *Nicotiana tabacum* do tipo silvestre, PGMs *NahG* (PGMs de tabaco expressando o gene *NahG* bacteriana) e tabaco GM *CSA*, que foram inoculadas com o *G. mosseae*. Durante o início do desenvolvimento, as plantas *NahG* obtiveram melhores níveis de colonização radicular, enquanto que, em plantas de *CSA*, a micorrização foi reduzida.

No entanto, no final do experimento, a colonização foi semelhante em ambas as PGMs e silvestres, indicando que o aumento dos níveis de ácido salicílico (AS). O acúmulo de AS foi proposto como um marcador endógeno para a resistência das plantas, ligando melhorados níveis AS em plantas, para uma susceptibilidade reduzida destas plantas aos patógenos podem, por vezes, atrasar a colonização do FMA nestas raízes, mas, neste último caso, eles não afetaram o nível de colonização radicular (Medina *et al.*, 2003). Algumas literaturas relevantes e os seus principais resultados estão listados na (Tabela 1)

Tabela 1. Visão geral das pesquisas sobre os efeitos de PGMs na colonização dos FMAs

| Plantas GM | Modificações | Principais resultados | Autores |
|-------------------|----------------------------|---|--------------------------------------|
| Arroz | <i>Chitinase</i> (RC24) | A taxa de colonização radicular diminuiu significativamente; | Yang <i>et al.</i> , (2002) |
| Tabaco | <i>NahG</i> | PGMs de tabaco <i>CSA</i> , as micorrizas foram reduzidas. A colonização radicular nas plantas silvestres e GM (<i>NahG</i> e <i>CSA</i>) com <i>G.mosseae</i> , foram semelhantes; | Medina <i>et al.</i> , (2003) |
| Milho | <i>Cry1Ab</i> | PGMs de milho <i>Bt176</i> reduziram significativamente o crescimento das hifas na fase pré-simbiótica e o desenvolvimento de apressórios por <i>G. mosseae</i> ; | Turrini <i>et al.</i> , (2004a) |
| Milho | <i>Cry1Ab</i> | Foram detectados baixos níveis de colonização micorrízica nas raízes de milho GM <i>Bt176</i> , inoculadas por <i>G.mosseae</i> ; | Castaldini <i>et al.</i> , (2005) |
| Milho | <i>Cry1Ab</i> | PGMs de milho, contendo genes do solo <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) ou não- <i>(Bt)</i> , a colonização destas raízes com FMAs variaram entre 19% e 39%; | Fließbach <i>et al.</i> , (2012) |

3. PGMs e alterações na comunidade microbiana da rizosfera

Vários estudos têm se dedicado a comparar os efeitos da exsudação radicular de PGMs e suas conseqüentes alterações na comunidade microbiana da rizosfera (Ceccherini *et al.*, 2003; Bruinsma *et al.*, 2003; Liu, 2010; Bouasria *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2013). Além disso, os mesmos autores demonstraram avanços significativos na avaliação de riscos ambientais, especialmente através da possível transferência horizontal de genes (THG) (Ceccherini *et al.*, 2003) das PGMs, na microbiota dos solos.

A atividade microbiana tem como principal fonte de nutrientes os compostos orgânicos excretados principalmente pelas raízes na forma de exsudatos (Singh *et al.*, 2007; Chaparro *et al.*, 2013). No entanto, reduzidas revisões abrangem os efeitos de PGMs em comunidades de FMAs. Nos últimos anos, a importância do FMAs nas avaliações de riscos ecológicos, foi destacada por alguns autores (Bruinsma *et al.*, 2003; Liu, 2010; Chaparro *et al.*, 2013).

Hannula *et al.*, (2010) relataram que FMAs (*Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota*), são propostos como potenciais indicadores biológicos de perturbação e agentes úteis em estratégias de monitoramento após a introdução de PGMs, como de batata (*Solanum tuberosum L.*) na rizosfera de solos *in situ*. Os fatores determinantes na composição destas comunidades, está no crescimento das plantas e na propriedade do solo. Outros estudos têm abordado os efeitos destes transgenes nas estruturas das comunidades de fungos (Verbruggen *et al.*, 2010).

Milling *et al.*, (2004) observaram tendências nas alterações dos perfis da comunidade bacteriana total e de grupos específicos, como alfa e betaproteobacterias, actinomicetos e pseudomonas, na rizosfera de batatas GM (*S. tuberosum L.*) com composição de amido alterada. Este estudo demonstrou que a transgenia pode diretamente ou indiretamente modificar a estrutura de comunidades específicas do solo. Entretanto, outros estudos investigaram os efeitos das PGMs nas estruturas das comunidades bacterianas (Rasche *et al.*, 2006; Weinert *et al.*, 2009) e funcionamento (Verbruggen *et al.*, 2010).

Bruinsma *et al.*, (2003) pesquisaram os efeitos das PGMs sobre os microrganismos do solo (fungos e bactérias), através de técnicas tradicionais como: número mais provável (NMP), seguida de “Pour Plate” de contagem em placas de Petri, ou de técnicas moleculares: PCR, ERIC-PCR, T-RFLP, SSCP e DGGE, detectando amplas variações ou tendências diferentes em extensão e intensidade. Outros estudos demonstraram efeitos transitórios e temporários da atividade enzimática no solo e da estrutura bacteriana associada à rizosfera (Rasche *et al.*, 2006).

Chaparro *et al.*, (2013) observaram que os exsudatos de *Arabidopsis*, *in vitro*, colhidas em diferentes fases de desenvolvimento e analisados por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa (CG-EM), revelaram que a composição dos exsudatos das raízes destas plantas, variaram em cada fase do desenvolvimento. Já os níveis de secreção cumulativa de açúcares e alcoóis foram maiores nos pontos de tempo iniciais e diminuiu ao longo do desenvolvimento. Em contraste, os níveis de secreção de aminoácidos e compostos fenólicos aumentaram ao longo do tempo.

De maneira geral, as alterações de uma população refletem na combinação dos efeitos das condições de recursos, migração, competição (intra e interespecífica), mutualismo, predação e parasitismo (Neal *et al.*, 2012). Entretanto, para o fornecimento de respostas completas a essas variantes, faz-se necessário conhecer as condições físicas e químicas, o nível de recursos disponíveis, o ciclo de vida dos organismos e a influência de competidores, predadores e parasitas. Paralelamente, os microrganismos que habitam o solo estão em constante disputa por água, nutrientes e energia (Neal *et al.*, 2012). Esse fator também

delimita sua capacidade competitiva, pois na rizosfera a fonte de carbono (C) liberada pela planta é limitada.

As plantas estão expostas a uma grande variedade de microrganismos ubiquamente distribuídos, sendo que os mesmos possuem funções-chave nos ecossistemas, dentre estes, destacam-se os FMAs (Soares e Carneiro, 2010; Ramos *et al.*, 2011).

4. Biologia e desenvolvimento das micorrizas arbusculares (MAs)

Estudos de fósseis de plantas da era Devoniana evidenciam que a associação micorrízica arbuscular existe há pelo menos 400 milhões de anos (Remy *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 2011). Estimativas feitas com o relógio molecular (18S rRNA), calibrado com esse dado fóssil e taxas de substituição de nucleotídeos dessa sub-unidade menor do gene ribossomal, apontam que a origem dos principais grupos de fungos terrestres (glomeromicetos, ascomicetos e basidiomicetos) ocorreu há mais de 600 milhões de anos (Redecker, *et al.*, 2000a), porém não foi encontrado sinal de simbiose. Os FMAs, Filo *Glomeromycota*, Classe *glomeromycetes*, são uma das mais antigas, conspícuas e ecologicamente importantes simbioses da terra (Ramos *et al.*, 2011). Sua ocorrência é notável nos ecossistemas, associando-se com mais de 80% das espécies de plantas, formando assim, uma relação simbiótica mutualística denominada MAs (Ferreira *et al.*, 2012).

Os FMAs são recentemente classificados em 5 ordens, 14 famílias e 26 gêneros, com pouco mais de 230 espécies descritas (Stürmer, 2012) (Tabela 2).

A genética desses fungos ainda é pouco conhecida (De Souza *et al.*, 2008). Até recentemente, os *glomeromycetes* eram considerados organismos exclusivamente clonais (De Souza *et al.*, 2008). Os esporos são multinucleados e podem conter, dependendo da espécie, centenas a milhares de núcleos (Pawlowska e Taylor, 2004). Outros glomeromicetos estudados apresentam genomas com tamanho maior (ver detalhes De Souza *et al.*, 2008).

Os FMAs são considerados biotróficos obrigatórios (Folli-Pereira *et al.*, 2012). Essa característica é esperada em simbioses altamente evoluídas, em que o microsimbionte se torna totalmente dependente do macrosimbionte. Como consequência, esses fungos precisam estabelecer simbiose com raízes de plantas compatíveis para que possam completar seu ciclo de vida. Geralmente mostram-se pouca especificidade, e os fatores que determinam se micorrizas são formadas ou não, parecem depender do genótipo da planta hospedeira. A evidência para isso é a existência de espécies de plantas GM não nodulantes (nod^-) são

incapazes de formar simbiose MA, sendo denominadas (myc⁻), sugerindo que a parte das vias de transdução de sinais ambos os simbiontes são análogas (Ramos *et al.*, 2011).

Tabela 2. Classificação atual dos FMAs no reino fungi

| Filo-Classe-Ordem | Famílias | Gêneros |
|-------------------------------|------------------------------------|--|
| Filo: Glomeromycota | | |
| Classe: Glomeromycetes | | |
| Ordem: Glomerales | Glomeraceae | <i>Glomus</i> <i>Funneliformis</i> <i>Simiglomus</i> <i>Septoglomus</i> |
| | Claroideoglomeraceae | <i>Claroideoglomus</i> <i>Viscospora</i> |
| Ordem: Diversisporales | Diversisporaceae | <i>Diversispora</i> <i>Redeckera</i> <i>Otospora</i> |
| | Entrophosporaceae | <i>Entrophospora</i> |
| | Acaulosporaceae | <i>Acaulospora</i> <i>Kuklospora</i> |
| | Pacisporaceae | <i>Pacispora</i> |
| | Ordem: Gigasporales | Gigasporaceae |
| | Scutellosporaceae | <i>Scutellospora</i> <i>Orbispora</i> |
| | Racocetraceae | <i>Racocetra</i> <i>Cetraspora</i> |
| | Dentiscutataceae | <i>Dentiscutata</i> <i>Fuscutata</i> <i>Quatunica</i> |
| | Classe: Archaeosporomycetes | |
| Ordem: Archaeosporales | Archaeosporaceae | <i>Archaeospora</i> <i>Intraspora</i> |
| | Ambisporaceae | <i>Ambispora</i> |
| | Geosiphonaceae | <i>Geosiphon</i> |
| | Classe: Paraglomeromycetes | |
| Ordem: Paraglomerales | Paraglomeraceae | <i>Paraglomus</i> |

Modificado (Stürmer, 2012).

Dentro do reino fungi, glomerosporos são assexuais (Goto e Maia, 2006). Na reprodução assexual os organismos tendem a acumular mutações deletérias devido as falhas durante o crescimento somático. As vesículas são estruturas globosas que ocorrem intra e extracelularmente, com função de reserva (lipídeo) para o fungo, as quais são formadas em apenas alguns gêneros (Bonfante-Fasolo, 1984). As hifas são importantes na aquisição e translocação de metabólitos do solo para a planta (Folli-Pereira *et al.*, 2012). O micélio é asseptado (cenocítico) (Moreira e Siqueira, 2006). Essas hifas diferenciam-se em apressórios na superfície da raiz e colonizam o tecido cortical, tanto intercelular quanto intracelularmente (Kiriacheck *et al.*, 2009). Dependendo do genótipo vegetal em certas células do córtex, hifas intracelulares se diferenciam em arbúsculos, que formam invaginações no interior das células do parênquima cortical radicular vegetal, podendo assumir um padrão *Arum* ou *Paris*, sendo circundados por uma membrana plasmática diferenciada de origem vegetal, chamada Periarbuscular (Folli-Pereira *et al.*, 2012). São importantes nos processos de troca de nutrientes entre simbioses em até 80% de P, 60% de cobre (Cu), 25% de nitrogênio (N), 25% de zinco (Zn) e 10% de potássio (K) (Moreira *et al.*, 2010). Nesta troca de nutrientes, as H^+ -ATPase da membrana plasmática da planta e fungo (Figura 1) são responsáveis pelo efluxo unidirecional de íons H^+ a catálise de moléculas de ATP, denominado de transporte primário de H^+ (Figura 1). Assim o gradiente eletroquímico gerado pelas ATPases impulsionam o influxo de macromoléculas e outros nutrientes via transportadores de membrana, representado pelo transporte secundário (Figura 1) (Ramos *et al.*, 2011).

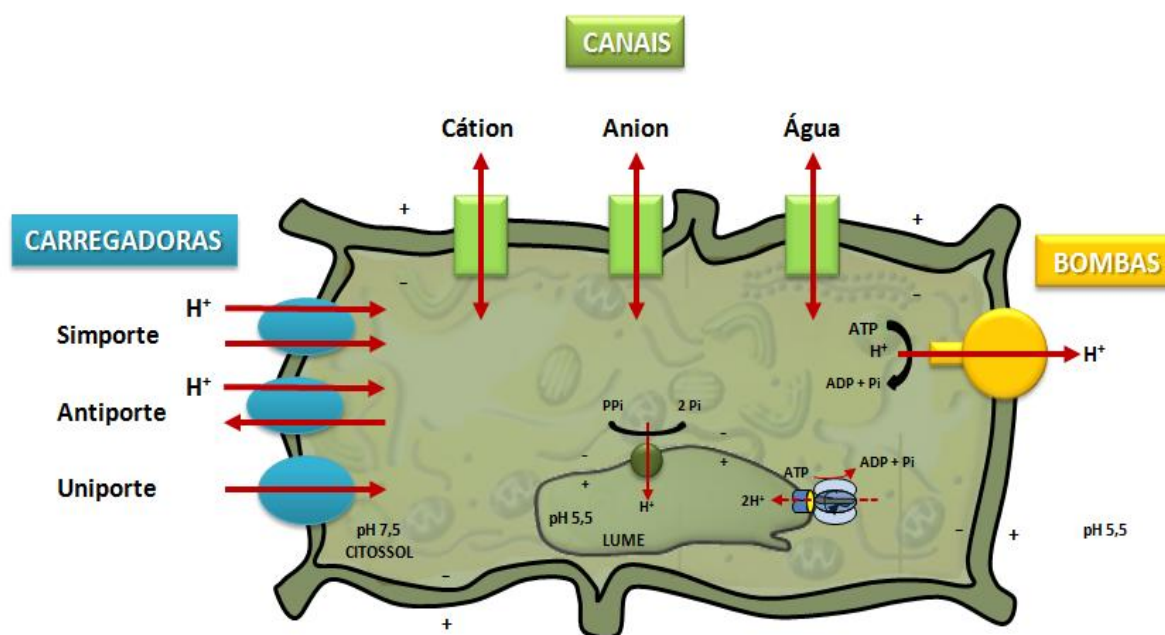


Figura 1. Transporte primário e secundário pela membrana plasmática. O gradiente eletroquímico criado pela H^+ -ATPase é usado por transportadores secundários para movimentar íons e compostos orgânicos pela membrana. O transporte de água pelas aquaporinas pode não responder diretamente ao gradiente eletroquímico de H^+ , todavia responde ao potencial osmótico e dessa forma, ao movimento de solutos. Modificado (Morsomme e Boutry, 2000).

Aqui são propostos modelos inéditos, do transporte primário e secundário pela membrana plasmática (Figura 1) e as etapas de desenvolvimento dos FMAs (Figura 2).

Apesar da colonização dos FMAs se restringirem ao ambiente da raiz, respostas ecofisiológicas diversas podem ser observadas na parte aérea do hospedeiro (Sena *et al.*, 2004). Dentre estas respostas, estão as alterações no processo fotossintético (Sena *et al.*, 2004), crescimento vegetal (Tabela 3), redução na incidência de ataques patógenos nas raízes (Borges *et al.*, 2007), resistência ao déficit hídrico (Moratelli *et al.*, 2007), tolerância das plantas a condições de estresse (Folli-Pereira *et al.*, 2012) e acumulação da biomassa microbiana em solos (Olsson e Wilhelmsson, 2000).

Tabela 3. As utilizações dos FMAs no crescimento vegetal

| Utilização | Mecanismos principais |
|-------------------------|--|
| Biofertilizadora | Acessos a nutrientes pouco disponíveis; Maior absorção e utilização de nutrientes do solo; Amenização de estresses nutricionais e nutrição balanceada; Favorecimento da nodulação e fixação de N_2 em leguminosas; |
| Biorreguladora | Atua na produção e acúmulo de substâncias reguladoras do crescimento; Interfere favoravelmente na relação água-plantas (aumenta tolerância a déficit hídrico); Alterações bioquímicas e fisiológicas (acúmulo de certos metabólitos secundários); |
| Biocontroladora | Efeitos benéficos na agregação das partículas do solo por meio da produção e liberação denominada glomalina, melhora a conservação da água e do solo; Ação de biocontrole sobre certos patógenos e pragas; Redução de danos causados por pragas e doenças; Amenização de estresses causados por fatores diversos como metais pesados e poluentes orgânicos; |

Modificado (Siqueira *et al.*, 2002).

O desenvolvimento das MAs é um processo complexo e assíncrono (Ramos *et al.*, 2011). Segundo Siqueira *et al.*, (2007), o estabelecimento e desenvolvimento MA é caracterizado com as seguintes fases: (i) **assimbiótica** pela germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo (Figura 2), (ii) **pré-simbiótica** na ramificação das hifas esporofíticas em resposta a fatores de ramificação produzidos pelas plantas (Figura 2), (iii) **simbiótica** através da diferenciação do apressório, penetração, colonização intraradicular e diferenciação e funcionamento do arbúsculo (Figura 2) e (iv) **esporulação** – o ciclo do fungo se completa, com a formação de novos esporos, os quais podem perdurar como esporos viáveis por longo tempo no solo.

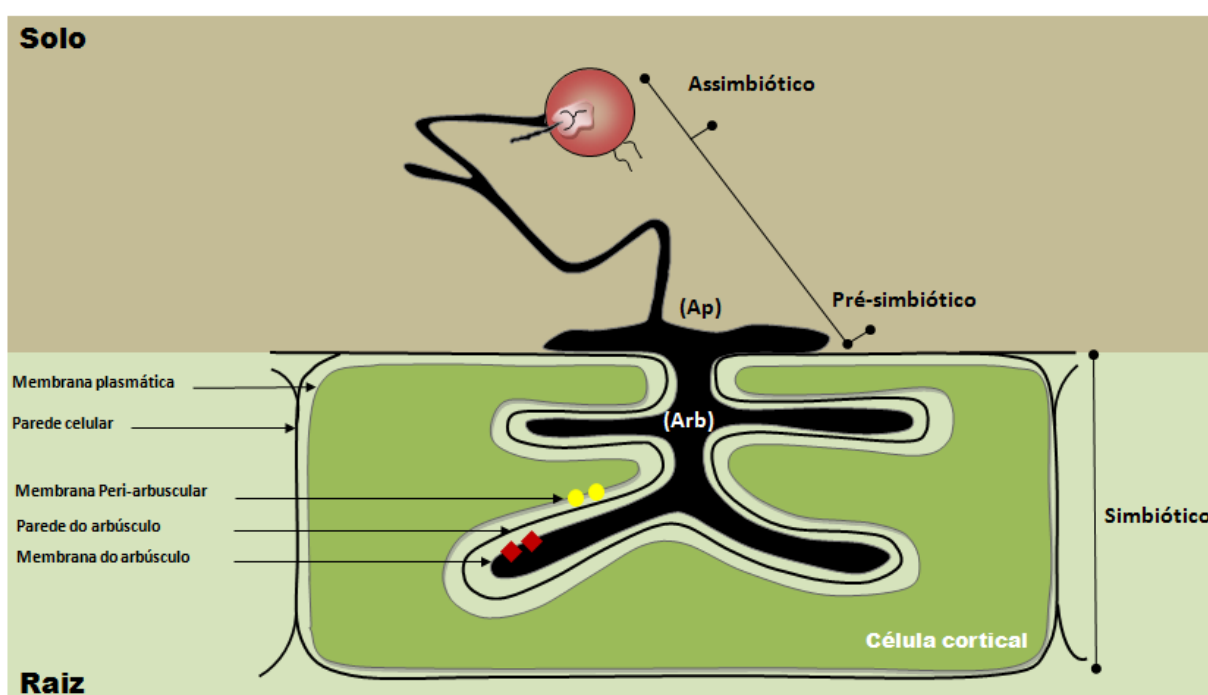


Figura 2. Etapas de desenvolvimento dos FMAs (**Assimbiótico**, **Pré-simbiótico** e **Simbiótico**) associados à diferenciação do apressório (**Ap**), desenvolvimento do arbúsculo (**Arb**) e formação das interfaces de troca em célula cortical vegetal radicular; O espaço entre a Membrana Peri-arbuscular e a Parede do arbúsculo é denominado de interface arbuscular. Os círculos, representam a localização das H^+ -ATPases da membrana Peri-arbuscular e os triângulos, as H^+ -ATPases dos FMAs. Modificado (Ramos *et al.*, 2005).

5. Mecanismo de defesa das plantas durante os estágios de interação planta-FMAs.

O estabelecimento dos FMAs envolvem complexos processos de desenvolvimento, concomitantemente nas alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares em ambos os simbioses (Moreira e Siqueira, 2006). Modificações na fisiologia da planta após a colonização micorrízica ativam mecanismos de defesa e pode explicar, pelo menos

parcialmente, a diminuição da suscetibilidade das plantas a patógenos. Esses efeitos podem surgir por meio de mudanças na formação de lignina (Saldajeno *et al.*, 2008), na produção de compostos fenólicos (Zeng, 2006) e aparecimento de novas isoformas das enzimas hidrolíticas, como quitinase e β -1,3-glucanase. Proteínas relacionadas à patogênese, acúmulos de fitoalexinas e lignificação da parede celular têm sido relatadas em plantas micorrizadas em locais distantes dos sítios de infecção, indicando assim a ocorrência de resistência sistêmica (Selosse *et al.*, 2004).

Os modos de ação e estratégias envolvidos na supressão de patógenos pelos FMAs podem ser resumidos em quatro grupos: (i) competição direta entre FMAs e patógenos; (ii) regulação da população microbiana no solo em torno do sistema radicular; (iii) modificações no crescimento, nutrição e morfologia vegetal; (iv) e alterações de ordens bioquímicas e moleculares nos hospedeiros vegetais (Costa e Lovato, 2011).

Plantas com maior atividade de enzimas antioxidativas mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses, e as micorrizas induzem aumento da atividade das enzimas antioxidativas, como peroxidase (PO), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Arfaoui *et al.*, 2007).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), ocorrem normalmente no metabolismo celular; podendo causar sérios danos ao metabolismo normal, por meio de danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A indução de enzimas antioxidantes que eliminam EROs, como SOD, PO e CAT, é um mecanismo de desintoxicação mais comum e que ocorre durante as respostas ao estresse oxidativo (Mittler, 2002). Em raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) colonizadas por *Glomus clarum*, SOD e CAT foram induzidas em raízes na fase final de desenvolvimento da simbiose, sob baixo nível de P (Lambais *et al.*, 2003).

4. Conclusões

Apesar dos avanços nos conhecimentos biotecnológicos de PGMs e bioquímicos da microbiota dos solos associados aos FMAs, esforços adicionais são necessários para elucidar tais mecanismos, como por exemplo, em avanços metodológicos especialmente na introdução de técnicas de biologia molecular, baseadas na análise do ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ribonucleico (RNA), além das vantagens de ser um processo rápido e de alta sensibilidade. Aliados a isso, o uso de controles apropriados nos procedimentos de avaliação de impacto e a determinação de variações que possam ocorrer naturalmente, são fatores-chave para uma boa interpretação dos resultados. As conclusões e sugestões sobre os avanços dos conhecimentos e aplicações metodológicas mencionados nesta fundamentação teórica, não devem ser visto como absoluto ou definitivo.

Trabalhos futuros, sobre os efeitos de exsudatos alterados em PGMs nos microrganismos do solo, devem envolver experimentos que utilizem ferramentas moleculares, baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos pela Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR-Polimerase Chain Reaction*), permitindo assim o avanço no conhecimento sobre: diversidade genética, caracterização, estrutura, dinâmica, variabilidade genética das populações de microrganismos e seus habitats e melhor compreensão da relação destes com as plantas. Abstendo-se dos detalhes, a eficiência desta técnica resume-se no uso de DNA em quantidade e qualidade adequadas para amplificação e a escolha de *primers* específicos para a região a ser estudada. Portanto, destacamos a ausência de uma técnica perfeita. Cabe ao pesquisador decidir qual o método ou conjunto de métodos mais adequados para responder às questões científicas propostas.

5. Referências

- Ahmad, P., Ashraf, M., Younis, M., Hu, X., Kumar, A., Akram, A.N. 2011. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnol Advandes*. 234, 133-146.
- Arfaoui, A., EL Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., Daayf, F., Chérif, M. 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* sp. *Plant Physiol*. 45, 470-479.
- Bonfante-Fasolo, P. 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell C. L., Bagyaraj, D. J. (Ed.). *V.A.Mycorrhiza*. 23, 5-33.
- Borges, A.J.S., Trindade, A.V., Matos, A.P., Peixoto, M.F.S. 2007. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42, 31-41.
- Bouasria, A., Mustafa, T., De Bello, F., Zinger, L., Lemperiere, G., Geremia, R.A., Choler, P. 2012. Changes in root-associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. *Europ.J.S.Biol*. 52, 59-66.
- Bruinsma, M., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology Fertility of Soils*. 37, 329-337.
- Ceccherini, M.T., Carneiro, C., Junior, O.J. 2003. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 673-678.
- Costa, M.D., Lovato, P.E. 2011. Micorrizas arbusculares e a supressão de patógenos. In: Klauberg-Filho, O., Mafra, A.L., Gatiboni, L.C., eds. *Tópicos em ciência do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 6, 119-139.
- Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M. 2013. Root Exudation of Phytochemicals in *Arabidopsis* Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *Plos One*. 8(2), 55731- 55735.

De Souza, F.A., Declerck, S., Smit, E., Kowalchuk, G.A. 2008. Comparison of parental and transgenic alfalfa rhizosphere bacterial communities using Biolog *GN* metabolic fingerprinting and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence. *Microb. Ecol.* 37, 129–139.

Ferreira, D.A., Carneiro, M.A.C., Junior, O, J, S. 2012. Fungos Micorrízicos Arbusculares em Latossolo Vermelho sob Manejos e usos no cerrado. *R. Bras. Ci. Solo.* 36, 51-61.

Ferrol, N., Pozo, M.J., Antelo, M., Azcón-Aguilar, C. 2002. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *J. Experimental Botany.* 53, 1683–1687.

Fließbach, A., Messmer, M., Nietlispach, B., Infante, V., Mäder, P. 2012. Effects of conventionally bred and *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) maize varieties on soil microbial biomass and activity. *Biol Fertil Soils.* 48, 315–324.

Folli-Pereira, M.S., Meira-Haddad, L.S., Bazzolli, D.M.S., Kasuya, M.C.M. 2012. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. *Rev. Bras. Ci. Solo.* 36, 1663-1679.

Gaxiola, R.A., Park, S., Li, J., Jon, K., Gerald, A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, D.K. 2005. Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *PNAS.* 102, 18830–18835.

Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. 2007. Plant proton pumps. *Febs Letters.* 581, 2204-2214.

Gaxiola, R.A. Paez-Valencia, J., Patron-Soberano, A., Rodriguez-Leviz, A., Sanchez-Lares, J., Sanchez-Gomez, C., Valencia-Mayoral, P., Diaz-Rosas, G. 2011. Plasma membrane localization of the type I (H⁺-PPase) *AVPI* in sieve element–companion cell complexes from *Arabidopsis thaliana*. 181, 23-20.

Gaxiola, R.A., Sanchez, C.A., Paez-Valencia, J., Ayre, B.G., Elser, J.J. 2012. Genetic manipulation of a vacuolar H⁺-PPase from salt tolerance to yield enhancement under. *Phosphorus Deficient Soils.* 159, 3-11.

Gaxiola, R.A., Paez-Valencia, J., Sanchez-Lares, J., Marsh, E., Dorneles, L.T., Santos, M.P., Sanchez, D., Winter, A., Murphy, S., Cox, J., Trzaska, M., Metler, J., Kozic, A., Façanha, A.R., Schachtman, D., Sanchez, C.A. 2013. Enhanced Proton Translocating Pyrophosphatase Activity Improves Nitrogen. *Eff. Rom. Lett.* 161, 1557-1569.

Goto, B.T., Maia, L.C. 2006. *Glomerospores*: a new denomination for the spores of *Glomeromycota*, a group molecularly distinct from the *Zygomycota*. *Mycotaxon.* 96, 129-132.

Hannula, S.E., Boer, W., van Veen, J.A. 2010. *In situ* dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biology Biochemistry.* 42, 2211–2223.

Kiriachek, S.G., Azevedo, L.C.B., Peres, L.E.P., Lambais, M.R. 2009. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo.* 33, 1–16.
Lambais, M.R., Rios-Ruiz, W.F., Anadrade R.M. 2000. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist.* 160, 421-428.

Lambais, M.R., Ríos-Ruiz, W.F., Andrade, R.M. 2003. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 160, 421-428.

Liu, W. 2010. Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecotoxicology.* 19, 229–238.

Medina, M.J.H., Gagnon, H., Piche, Y., Ocampo, J.A., Garrido, J.M.G., Vierheilig, H. 2003. Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Sci.* 164, 993–998.

Milling, A., Smalla, K., Maidl, F.X., Schloter, M., Munch, J.C. 2004. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil.* 266, 23-39.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410, 2002.

Moratelli, E. M., Andrade, V. C., Assis-Júnior, S.L. 2007. Efeito da disponibilidade de água e de luz na colonização micorrízica e no crescimento de *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb. (*Bignoniaceae*). Revista Árvore. 31, 555-566.

Moreira, F.M.S., Faria, S.M., Baleiro, F.C., Florentino, L.A. 2010. Bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas. In: Biotecnologia aplicada à agricultura: Embrapa Informação Tecnológica. Instituto agrônômico de Pernambuco (IPA). 761, 456-468.

Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. 2006. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ed. Lavras. Ufla. Rev. Bras. Ci. Solo., 729 p.

Morsomme, P, Boutry, M. 2000. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. Biochim. Biophys Acta. 1465, 1–16.

Neal, A.L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Ton, J. 2012. Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas putida* to the Rhizosphere. Plos One. 7, 35498-35501.

Olsson, P.A., Wilhelmsson, P. 2000. The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. Plant Soil. 226, 161-169.

Park, S., Li, J., Pittman, J.K., Berkowitz, G.A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K.D., Gaxiola, R.A. 2005. Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102, 18830-18835.

Powell. J.R., Gulden, R.H., Hart, M.M., Campbell, R.G., Levy-Booth, D.J., Dunfield, K.E., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T., Klironomos, J.N. 2007. Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. Appl. Environ Microbiol. 73, 4365–4367.

Pawlowska, T.E, Taylor, J.W. 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. Nature. 427, 733-737.

Rasche, D., Rinaldi, P.C., Young, R.F., Tronnier, V.M. 2006. Deep brain stimulation for the treatment of various chronic pain syndromes. *Neurosurgical Focus*. 21, 6-17.

Ramos, A.C., Martins, M.A., Façanha, R.A. 2005. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microcromossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 29, 207-213.

Ramos, A.C., Façanha, A.R., Palma, L.M., Okorokov, L.A., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G., Siqueira, A.F., Bertolazi, A.A., Canton, G.C., Melo, J., Santos, W.O., Schimitberger, V.M.B., Okorokova-Façanha, A.L. 2011. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz. J. Plant Physiol*. 23, 79-89.

Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E. 2000a. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*. 289, 1920-1921.

Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H. 1994. 4-Hundred-Million-Year-Old Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91, 11841-11843.

Saldajeno, M.G., Chandanie, W.A., Kubota, M., Hyakumachi, M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. *The Netherlands. Springer*. 23, 211-226.

Soares, C.R.F.S., Carneiro, M.A.C. 2010. Micorrizas arbusculares na recuperação de áreas degradadas. In: Siqueira, J.O., Souza, F.A., Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. (Eds) *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras. Editora Ufla. 34, 441-474.

Selosse, M.A., Baudoin, E., Vandenkoornhuyse, P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C.R. Biol*. 327, 639-648.

Senna, E.R., De Barros A.L., Silva, E.O. 2004. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the copcord approach. *J. Rheumatol*. 31, 594-603.

Stürmer, S.L. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum *Glomeromycota*. *Mycorrhiza Springer Verlag*. 22, 247-258.

Siqueira, J.O., Sylvia, D.M., Gibson, J., Hubbell, D.H. 2007. Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. In: Cereta, C.A., Silva, L.S., Reichert, J.M. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: SBCS. 33, 219-306.

Siqueira, J.O., Lambais, M.R., Stürmer, S.L. 2002. Fungos micorrízicos Arbusculares: Características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. 25, 12-21.

Singh, B.K., Munro, S., Potts, J.M., Millard, P. 2007. Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. Applied Soil Ecol. 36, 147-155.

Turrini, A., Sbrana, C., Nuti, M.P. 2004a. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil. 266, 69–75.

Verbruggen, E., Röling, W.F.M., Gamper, H.A., Kowalchuk, G.A., Verhoef, H.A. 2010. Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. New Phytologist. 186, 968–979.

Weinert, L.A., Tinsley, M.C., Temperley, M., Jiggins, F.M. 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. B.M.C. Biology. 23, 7:6

Zeng, R.S. 2006. Disease resistance in plants through mycorrhizal fungi induced allelochemicals. In: Inderjit, K.M., Mukerji, K.G., eds. Allelochemicals: Biological control of plant pathogens and diseases. Springer. 34, 181-192.

ARTIGO**Alterações bioquímicas e da comunidade microbiana da rizosfera de plantas transgênicas de tomateiro super-expressando a H⁺-PPase vacuolar*****Carlos Moacir Colodete¹ & Alessandro Coutinho Ramos¹✉**

¹Universidade Vila Velha-UVV. Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia (LMAB). Rua Comissário José Dantas de Melo 21, Boa Vista, Vila Velha–(ES), Brasil (BR).

✉Endereço para correspondência: alessandro.ramos@uvv.br

1. Introdução

Análises baseadas nos últimos relatórios do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), demonstram que entre 2011 e 2012, as áreas plantadas com transgênicos no mundo cresceram 6%, passando de 160 milhões de hectares para 170,3 milhões um incremento de 10,3 milhões. No mesmo período, o Brasil aumentou em 6,3 milhões de hectares o cultivo de plantas geneticamente modificadas (PGMs). As espécies de PGMs incluem principalmente o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays L.*), algodão (*Gossypium hirsutum L.*) e soja (*Glycine max*).

A relação entre PGMs e microrganismos do solo, tem se discutido nos últimos anos (Chaparro *et al.*, 2013). Entretanto, esta relação ainda não é bem compreendida (Neal, *et al.*, 2012). Alguns estudos envolvendo análises de fitoquímicos revelaram que a distribuição na densidade de microrganismos na rizosfera, são influenciados diretamente pelos exsudatos das plantas (Bouasria *et al.*, 2012; Neal, *et al.*, 2012; Chaparro *et al.*, 2013). Dentre as inúmeras relações biológicas ubiquamente encontradas no solo, destacam-se as simbioses mutualistas entre fungos e raízes de plantas, denominados FMAs (Stürmer, 2013). Neste contexto, os FMAs podem alterar a densidade das populações de fungos e bactérias da rizosfera e hifosfera (Chaparro *et al.*, 2013) e conseqüentemente, as atividades bioquímicas da microbiota do solo.

Os FMAs, Filo *Glomeromycota* (Stürmer *et al.*, 2013) são organismos biotróficos obrigatórios, suscetíveis a maioria das raízes de plantas vasculares, sendo uma das mais antigas, conspícuas e ecologicamente importantes simbioses da terra, formando uma relação mutualista denominada micorriza arbuscular (MA). A principal característica desta associação é a formação no córtex radicular das plantas em arbúsculos, estruturas micorrízicas responsáveis pelo movimento bidirecional de nutrientes absorvidos do solo para a planta, notadamente o fósforo (P) e a transferência açúcares derivados do processo fotossintético ao fungo (revisado por Ramos *et al.*, 2011). Além do aumento nutricional (biofertilizadora), plantas micorrizadas apresentam maior resistência aos agentes patogênicos e menor estresse (biocontroladora), regulação das alterações bioquímicas e fisiológicas (biorreguladora) (Siqueira *et al.*, 2002). Estudos citoquímicos têm mostrado que na simbiose micorrízica, gradientes intra e extracelulares de prótons (H^+) estão associados com o crescimento polarizado em células de plantas (Feijó *et al.*, 2004) e fungos (Ramos *et al.*, 2008a,c). Os transportadores secundários necessitam de um aporte de energia que é fornecido pelos sistemas de transporte primários localizados na membrana plasmática (H^+ -ATPases do tipo P) (Morsomme e Boutry, 2000) e no tonoplasto (H^+ -ATPases do tipo V e H^+ -PPase) (Rea *et al.*, 1992).

A penetração intrarradicular de plantas pelos FMAs promovem sequências bioquímicas diversas (Song *et al.*, 2011). Estes eventos incluem a percepção, transdução de sinais e ativação de genes de defesa (Song *et al.*, 2011). Após a percepção de um indutor, mudanças na permeabilidade iônica da membrana plasmática são observadas, como ativação de enzimas ligada à membrana, quinases e fosfatases (Kong *et al.*, 2012). As fosfatases são enzimas que contribuem positivamente na maior absorção de P no solo (Lundmark *et al.*, 2011). Nesse contexto, uma etapa do processo de mineralização e ação de enzimas que hidrolisam fosfato ligado organicamente no solo, estão as AcP ou AIP, sendo respectivamente classificadas como ácida ou alcalina de acordo com o seu pH ideal para catálise (Kong *et al.*, 2012).

A explosão oxidativa é uma resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno, conduzindo à reação de hipersensibilidade (HR). Esta resposta é devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$) (Song *et al.*, 2011). Quando em excesso, podem levar à oxidação de proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA, causando danos e eventual morte da célula (Tian *et al.*, 2013). Para evitar tais danos, as plantas promovem eficientes sistemas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx) e principalmente CAT (Tian *et al.*, 2013). Plantas que aumentam a produção de enzimas antioxidativas, mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses e as MAs podem induzir há aumentos das atividades e consequente nas atenuações bioquímicas e fisiológicas (Latef e Chaoxing, 2011). Em associações micorrízicas, as EROs atuam como mensageiro secundário e as alterações na expressão das enzimas antioxidativas, estão relacionadas com o desenvolvimento da simbiose.

Nossa hipótese sugere que *G.intraradices* BEG 24, apresentem alterações morfológicas em suas hifas asseptadas durante seu processo de colonização radicular em *AVPIOX*. Além disso, esperamos que *AVPIOX* possam modular a densidade microbiana (fungos e bactérias) na rizosfera, e que apresentem baixos níveis nas atividades enzimáticas de estresse oxidativos, inoculados ou não por *G.intraradices* BEG 24 e *S.heterogama* PNB 102 A. Sugerimos ainda, que *G.intraradices* BEG 24 e *S.heterogama* PNB 102 A possam revelar seu caráter biorregulador, suplementando as atenuações nas atividades bioquímicas em *AVPIOX*.

Este trabalho tem como objetivos, avaliar a colonização micorrízica inoculadas por *G.intraradices* BEG 24, atividades enzimáticas da CAT, AcP e AIP em raízes de *AVPIOX* e Wt, inoculados ou não com *G.intraradices* BEG 24 e *S.heterogama* PNB 102 A e o efeito da inoculação micorrízica nestas plantas na alteração microbiana da rizosfera.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais vegetais e fungo micorrízico arbuscular

As sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) transgênicos (AVPIOX) e silvestres (Wt) foram gentilmente concedidas pelo Dr. Roberto Gaxiola da Universidade do Arizona (EUA). Os inóculos *S.heterogama* PNB 102 A (Sh), foram obtidos da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota – (CICG) do Dr. Sidney Luiz Stürmer e os de *G.intraradices* BEG 24 (Gi), adquiridos do *Bank Exchange of Glomales* (BEG, Dijon – França).

Tanto os inóculos *S.heterogama* PNB 102 A, quanto o de *G.intraradices* BEG 24, foram multiplicados em associação com raízes de *Brachiaria brizanta* em vasos contendo areia e vermiculita 1:1 (v/v) como substrato e cultivadas na casa-de-vegetação da Universidade Vila Velha-UVV, Espírito Santo (ES), Brasil (BR).

2.2. Condições experimentais

As sementes AVPIOX e Wt foram inicialmente desinfestadas em hipoclorito de sódio 10% por 5 minutos, transferidas para álcool 70% por 3 minutos e lavadas sucessivamente em água deionizada estéril. Após esterilização, as sementes foram semeadas em bandejas de polipropileno JKS[®] contendo 15 cm³ de um substrato esterilizado, composto de areia (quartzo 12/20):terra vegetal, na proporção 1:2 (v/v). As plântulas foram crescidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h (dia/noite), intensidade luminosa de 250- 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 20 dias, as plântulas que apresentavam três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos plásticos de 3L, contendo substrato composto de areia (quartzo 12/20):solo argiloso (Latosolo Vermelho-Amarelo Distrófico), na proporção 2:1 (v/v). Foi coletado 100g de solo argiloso de barranco (0-20 cm) de camada, no município de Laranja da Terra-ES (19°53'38"S, 41°3'42"O) a 182 m, sendo seco ao ar, destorrado e passado em peneira 2 mm. Após preparada, a mistura foi esterelizada, autoclavada 1h a 121°C e armazenada em temperatura ambiente.

A inoculação das plantas com os FMAs foram feitas no transplantio, aplicando-se 30 mL dos inóculos de *S.heterogama* PNB 102 A ou *G.intraradices* BEG 24, compostos por uma mistura de solo, esporos fúngicos e fragmentos de hifas e raízes de *B. brizanta* colonizadas, obtidas dos vasos de multiplicação. Os tratamentos foram definidos como: não inoculado (Controle), inoculado com *S.heterogama* PNB 102 A e inoculado com *G.intraradices* BEG 24. Os tratamentos não inoculados receberam o mesmo substrato, porém 30 mL de areia (quartzo 12/20) (em substituição aos inóculos), previamente autoclavados 1h a

121°C. Semanalmente, as plantas foram suplementadas com solução de Clark (Clark, 1975) ¼ da força (Tabela 1).

Tabela 1. Solução modificada de Clark, diluída em ¼ da força, utilizada nos experimentos com micorrizas.

| Composição Química | Concentração Estoque | Concentração Final | Quantidade a adicionar |
|---|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| | Macronutrientes ^a | | |
| | -----M----- | -----mM----- | -----ml L ⁻¹ ----- |
| NaH ₂ PO ₄ | 0.037 | 0.056 | 0.5 |
| MgSO ₄ | 1 | 0.6 | 0.6 |
| NH ₄ NO ₃ | 1 | 0.9 | 0.9 |
| KCL | 1 | 0.5 | 0.5 |
| KNO ₃ | 1 | 1.3 | 1.3 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 1 | 2.53 | 2.53 |
| Sol. | | | 1 mL |
| Sol. Fe-EDTA | | | 1 mL |
| MES*(optativo) | 50 mM | 0.05 mM | 1 mL |
| | Micronutrientes ^b | | |
| | -----mM----- | -----µM----- | -----ml L ⁻¹ ----- |
| Micronutrientes | - | - | 1,00 |
| H ₃ BO ₃ | 13,3 | 13,3 | - |
| MnCl ₂ . 4 H ₂ O | 7 | 7 | - |
| ZnSO ₄ . 7 H ₂ O | 2 | 2 | - |
| CuSO ₄ . 5 H ₂ O | 0,5 | 0,5 | - |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O | 0,086 | 0,086 | - |
| Na ₂ FeEDTA ^c | 82,35 | - | 1,00 |

^aSoluções de macronutrientes independentes; ^bSolução contendo todos micronutrientes (exceto Ferro); ^cSolução de Fe-EDTA independente, adicionada por último.

As avaliações foram feitas no Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia Ambiental (LMAB), aos 70 d.a.i e as raízes foram lavadas em água corrente e o excesso de umidade foi removido com papel absorvente.

Foram retirados pequenos fragmentos de 2-3 cm ao longo de toda a raiz, para avaliação da colonização micorrízica. As raízes restantes foram imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para as análises enzimáticas.

2.3. Determinação da taxa de colonização micorrízica

Aos 70 d.a.i, avaliaram-se as taxas de colonização micorrízica em raízes de *AVPIOX* e *Wt*, determinadas conforme método de Koske e Gemma, (1989) e Grace Stribey, (1991).

A porcentagem do comprimento de raízes colonizadas, foram avaliadas pelo método da intersecção em placa quadriculada como descrito por Giovanetti e Mosse (1980), adaptado a partir do método de medidas de comprimento de raízes, através de um microscópico estereoscópio *Bel Photonics*, Suíça. Forão avaliados o número de hifas, arbúsculos, vesículas, células auxiliares nas respectivas raízes, levando-se em consideração os que possuem estas estruturas, no LMAB, UVV, ES/BR.

2.4. Atividades de enzimas do estresse oxidativo

Para a realização das atividades enzimáticas, foram maceradas 0,3 g de raízes em nitrogênio líquido.

Em seguida, foi adicionado 0,9 mL de um tampão de extração adaptado de Bor *et al.*, (2003), constituído de 883,8 µL de tampão fosfato 0.1M pH 7, 9 µL de EDTA 0,1M, 3.6 µL de DTT 0.5 M, 7.2 µL de PMSF 0,1M e 18 mg de PVPP.

Após homogeneização, o extrato enzimático foi centrifugado a 15.000 g, por 15 minutos, a 4°C. A concentração de proteína foi determinada de acordo com metodologia descrita por Lowry *et al.*, (1951) usando gama globulina sérica bovina como padrão (BSA). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e procedeu as determinações das atividades das enzimas CAT, AcP e AIP , no LMAB, UVV, ES/BR.

2.4.1. Catalase (E.C. 1.11.1.6)

As atividades da CAT foram determinadas como descrito por Beutler, (1975), adicionando-se em 20 µL do extrato enzimático, 0.98 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.0 e 12.5 mM de H₂O₂ dissolvido em tampão adaptado por Madhusudhan *et al.*, (2003).

As atividades enzimáticas foram determinadas pelo acompanhamento da queda da absorbância a 240 nm, a 25°C, por 2 minutos, em intervalos de 15 segundos, e calculada com base no fator de extinção de 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.4.2 Fosfatase ácida (E.C. 3.1.3.2) e alcalina (E.C. 3.13.1)

As atividades das AcP e AIP, foram determinadas de acordo com Barred, (1972) utilizando para-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato. Amostras de extrato enzimático foram incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo 20 mM tampão, 10 mM MgCl₂, 100 mM pNPP e acetato de sódio pH 5.0, para a atividades de AcP e 20 mM de tampão bicarbonato de sódio pH 9.2 para as atividades da AIP. Ambas atividades enzimáticas, foram determinadas com base na formação de P-nitrofenol (pNPP) a 40 nM. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μM de pNPP/Mg proteína/minuto, a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 mM NaOH.

2.5. Montagem dos vasos tipo Rizotubo

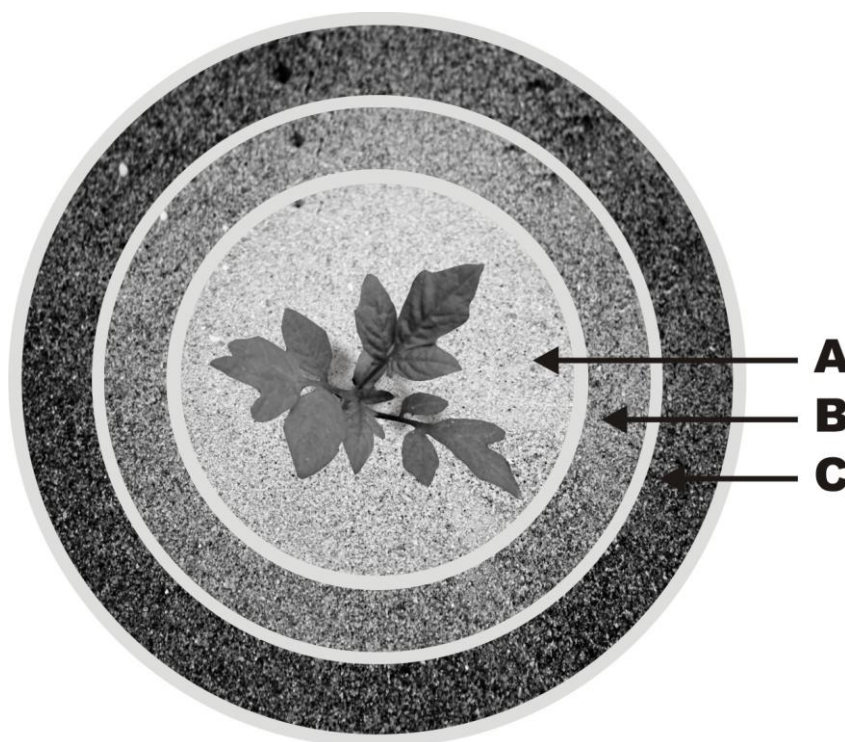


Figura 1. Rizotubo - Os espaços entre os compartimentos (A/B/C). O compartimento (A) foi estabelecido, somente como o local de crescimento em plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* e tipo silvestre *Wt* inoculados ou não, com FMA *S.heterogama*. O compartimento (B) adjacente ao central, amostrado como rizosfera do solo e o compartimento (C) estabelecido como solo adjacente.

A montagem dos vasos em rizotubo (Figura 1), através do conjunto de tubos PVC (cloreto de polivinila) (Figura 2) (*AVPIOX/AVPIOX+Sh/Wt/Wt+Sh*), com cinco repetições, contendo três compartimentos (Figura 2), com diferentes tamanhos e diâmetros (Figura 2).

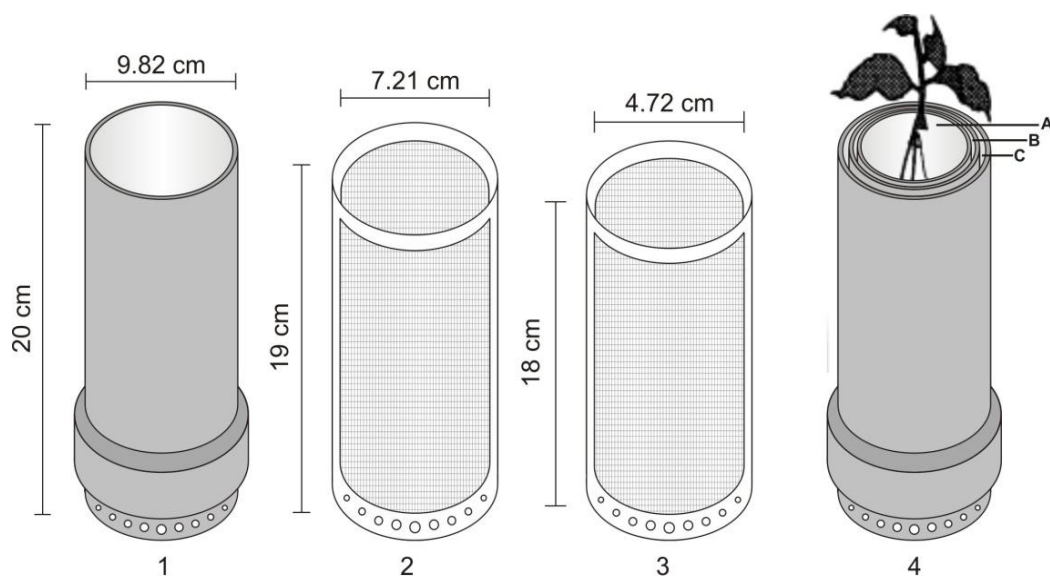


Figura 2. Um conjunto de tubos de PVC com três compartimentos, de diferentes tamanhos e diâmetros (Modelo 4). Modelo proposto para análise na dinâmica da população microbiana (fungos e bactérias) em plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* e tipo silvestre *Wt*, inoculado ou não com FMA *S.heterogama* (*AVPIOX/AVPIOX+Sh/Wt/Wt+Sh*). Dos três tubos, somente o (Modelo 2) e (Modelo 3) foram utilizados nylon com tela Millipore de 50 μm , sendo o tomateiros crescidos nos compartimentos centrais (Modelo 3). Nos espaços entre os compartimentos (A/B/C) (Modelo 4), o (A) determinado como rizoplano e atribuído como local de crescimento em plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* e tipo silvestre *Wt*, inoculados ou não com *S.heterogama*. Já o (B) adjacente ao central foi amostrado como solo rizosférico e o (C) como solo adjacente.

A montagem dos vasos (Figura 1) e conjuntos de tubos (Figura 2) objetivou avaliar os efeitos da micorrização do inóculo *S.heterogama* PNB 102 A, sobre a densidade da microbiota do solo (fungos e bactérias), em diferentes planos (rizoplano/rizosfera/solo adjacente) e distâncias das raízes de *AVPIOX*. Todo solo do compartimento A (Figura 1) (Figura 2), foram autoclavados e os demais sem autoclavagem, ou seja, com a microbiota natural.

Dos três tubos (1, 2 e 3) (Figura 2), o compartimento central (A) rizoplano (Figura 1), foi envolto com uma tela Millipore de nylon de 50 μm de diâmetro e contendo na parte central as *AVPIOX* e *Wt*, inoculados ou não com FMA.

Esta tela Millipore de nylon 50 μm permite apenas a passagem de hifas do FMA e impede a passagem de raízes das plantas. Já o compartimento (B) (Figura 1), de menor espessura, adjacente ao central (A), foi denominado de rizosfera do solo, e por fim o compartimento (C) (Figura 1) como (solo).

2.6. Contagem da população microbiana

Para a determinação das populações de fungos e bactérias foram realizadas utilizando-se a técnica de número mais provável (NMP), seguida de “*Pour Plate*” de contagem em placas de Petri segundo Fredslund *et al.*, (2001).

Preparou-se uma diluição seriada decimal em série, adicionando-se 10g da amostra de solo (contendo raízes de tomateiro colonizadas ou não) em Erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada 0,1% estéril. Após agitação da mistura, prepara-se a partir desta, diluições de 10^{-2} a 10^{-3} pelas sucessivas transferências de 1,0 ml de suspensão mais concentrada de solo, para tubos de ensaio contendo 9,0 ml de água peptonada a 0,1% estéril. Da diluição 10^{-3} , transferiu-se 0,2 ml para placas de Petri estéreis, contendo ágar Padrão para contagem de bactérias (PCA) ou ágar *Sabouraud* com Cloranfenicol para contagem de fungos, empregando-se um ligeiro movimento em forma de oito para melhor homogeneização do inóculo.

Em seguida, as placas para contagem de bactérias foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas e as placas para contagem de fungos em Estufa Incubadora para B.O.D. por cinco dias a 25°C. O processo de contagem foi realizado por meio de método direto com o auxílio do Contador de Colônias CP-602, em contraste com o meio opaco da cultura. As placas foram escaneadas, as imagens invertidas para negativo e as colônias contadas por meio do Software ImageJ©, como contagem adicional.

2.7. Análises Estatísticas

Para a determinação da taxa de colonização micorrízica e atividades enzimáticas da CAT, AcP e AIP, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 3 \times 1$, constando de 2 materiais vegetais *AVPIOX/Wt*, 3 tratamentos microbiológicos Controle, *S.heterogama* PNB 102 A e *G.intraradices* BEG 24, 1 época de amostragem 70 d.a.i., com cinco repetições.

Para avaliação da alteração microbiana na rizosfera de plantas *AVPIOX*, utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 1$, constando de 2 materiais vegetais *AVPIOX/Wt*, 2 tratamentos microbiológicos Controle/*S.heterogama* PNB 102 A, 1 época de amostragem 70 d.a.i., com cinco repetições, por meio de modelos inéditos, denominados rizotubo (Figura 1).

Os resultados foram analisados por meio de teste t-student ou análise de variância seguida de comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância, utilizando o programa computacional SAEG-UFV (Euclides, 1983).

3. Resultados e discussão

3.1. Colonização micorrízica radicular

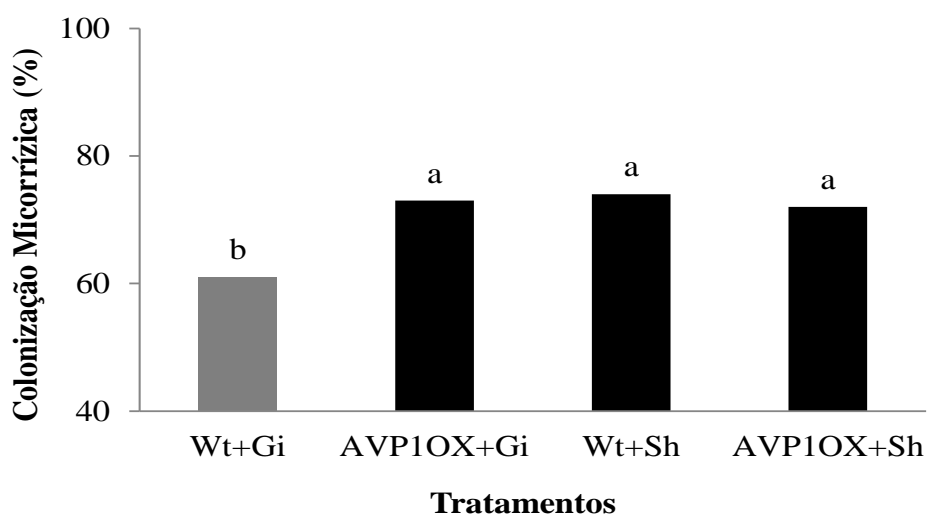


Figura 3. Porcentagem de colonização micorrízica de plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* e tipo silvestre *Wt*, inoculadas com FMAs *G.intraradices* e *S.heterogama* aos 70 dai. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da colonização micorrízica, demonstraram que *AVPIOX* inoculadas com *G.intraradices* (*AVPIOX+Gi*) (Figura 3), apresentaram aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 17% em comparação com *Wt* inoculadas com *G.intraradices* (*Wt+Gi*) (Figura 3), indicando comportamentos positivos de *AVPIOX+Gi*. Estes resultados estão de acordo com David-Schwartz *et al.*, (2001). Os mesmos autores também evidenciaram efeitos significativamente positivos na colonização por *Glomus intraradices* em raízes de tomateiro GM (*Lycopersicon esculentum*), Micro-Tom, gene *M161*. Entretanto, no mesmo período, plantas inoculadas com *S.heterogama*, (*Wt+Sh*) ou (*AVPIOX+Sh*), não apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) (Figura 3).

Esta diferença entre as espécies de FMAs (Figura 3) podem ser explicadas, pelo fato de fungos do gênero *Scutellospora* não formarem vesículas intrarradiculares (Silveira *et al.*, 2002; Stürmer *et al.*, 2013). Muitos autores acreditam que a espécie *G.intraradices*, devido à presença de vesículas, com função de reserva energética (lipídeo), tenham potencial de resposta no hospedeiro, superior à espécie *Scutellospora* spp. (Stürmer *et al.*, 2013).

Adicionalmente, especulamos através de nossos resultados (Figura 3), possíveis aumentos nos processos relacionados à defesa do hospedeiro durante as interações fungo-planta (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2013).

Curiosamente, Shaul *et al.*, (2000) discutiram o possível envolvimento de um mecanismo de supressão na espécie *G.intraradices* na interação ao tabaco silvestre (*Nicotiana tabacum* L.). Já Vierheilig *et al.*, (1995) demonstraram que as plantas de tabaco GM que sobre-expressam alguns dos genes com propriedades antimicrobianas não continham colonização micorrízica. Fließbach *et al.*, (2012) demonstraram que em plantas GM de milho, contendo genes do solo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ou não-*(Bt)*, a colonização destas raízes com FMA variaram entre 19% e 39%. Essas inconsistências na expressão de genes com propriedades antimicrobianas revelaram que as reações de defesa, não respondem a invasão de fungos (Dumas-Gaudot *et al.*, 2000).

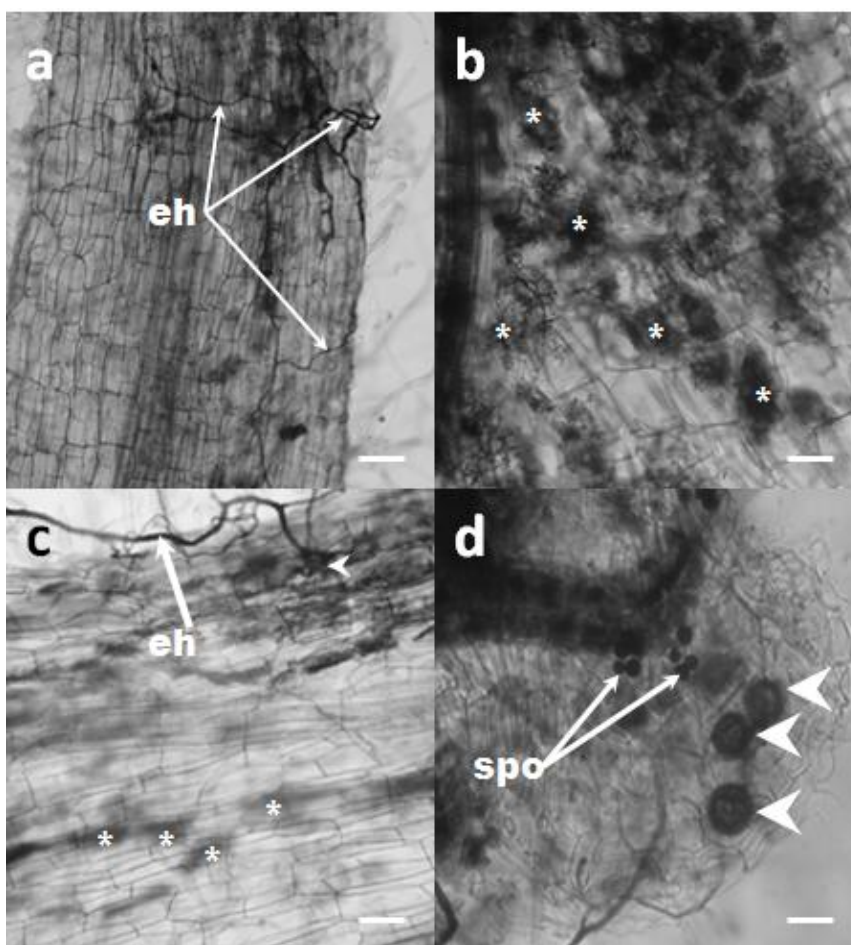


Figura 4. Micrografia óptica nas raízes das plantas de tomateiro do tipo silvestre Wt, colonizada pelo FMA *G. intraradices*, mostrando: (a) Hifas externa (eh), bar = 50 µm. (b), Arbúsculos (*), bar = 50 µm. (c) Um único apressório (com seta) formado pela hifa externa (eh) com arbúsculos (*), = bar = 50 µm e (d) Vesículas (com setas) e esporos (spo), bar = 50 µm.

Pode-se concluir que o reconhecimento dos sinais pelo hospedeiro, não provoquem respostas de defesa, ou estas respostas são rapidamente reprimidas pelo

mecanismo induzido por *G.intraradices*. A existência de plantas que apresentam respostas de defesa e plantas que não, assim como plantas que suprimem suas reações de defesa durante a formação da micorriza, sugerem o envolvimento de processos coevolutivos no desenvolvimento desta simbiose.

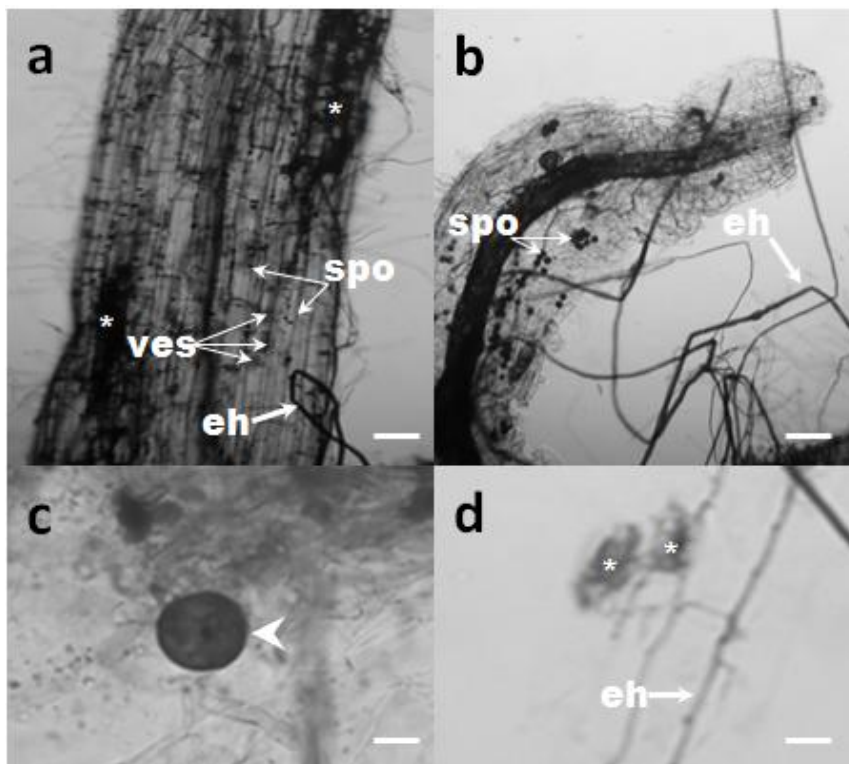


Figura 5. Micrografia óptica nas raízes das plantas de tomateiro do tipo silvestre Wt, colonizada pelo FMA *G. intraradices*, mostrando: (a) As raízes com arbúsculos (*), Esporos (spo), Vesículas (ves) e hifa externa (eh), bar = 50 μ m. (b) Esporos (spo) com hifas externas (eh), bar = 50 μ m. (c) As vesículas isoladas (com seta), bar = 50 μ m. (d) arbúsculos isolados (*) e hifas externas (eh), bar = 50 μ m.

Raízes de Wt colonizadas com *G.intraradices*, apresentaram um grande número de arbúsculos (Figura 4b, Figura 4c, Figura 5a), esporos (Figura 5d, Figura 5a e Figura 5b), vesículas (Figura 4d e Figura 5a) e vesícula individual (Figura 5c). As hifas demonstraram um comportamento normal e sem engrossamento (Figura 4a, Figura 4c, Figura 5a, Figura 5b e Figura 5d), inclusive com formação de apressórios (Figura 4c). Vale ressaltar que as estruturas dos fungos obtiveram distribuição homogênea pelas raízes (Figura 5a) indicando uma colonização micorrízica normal.

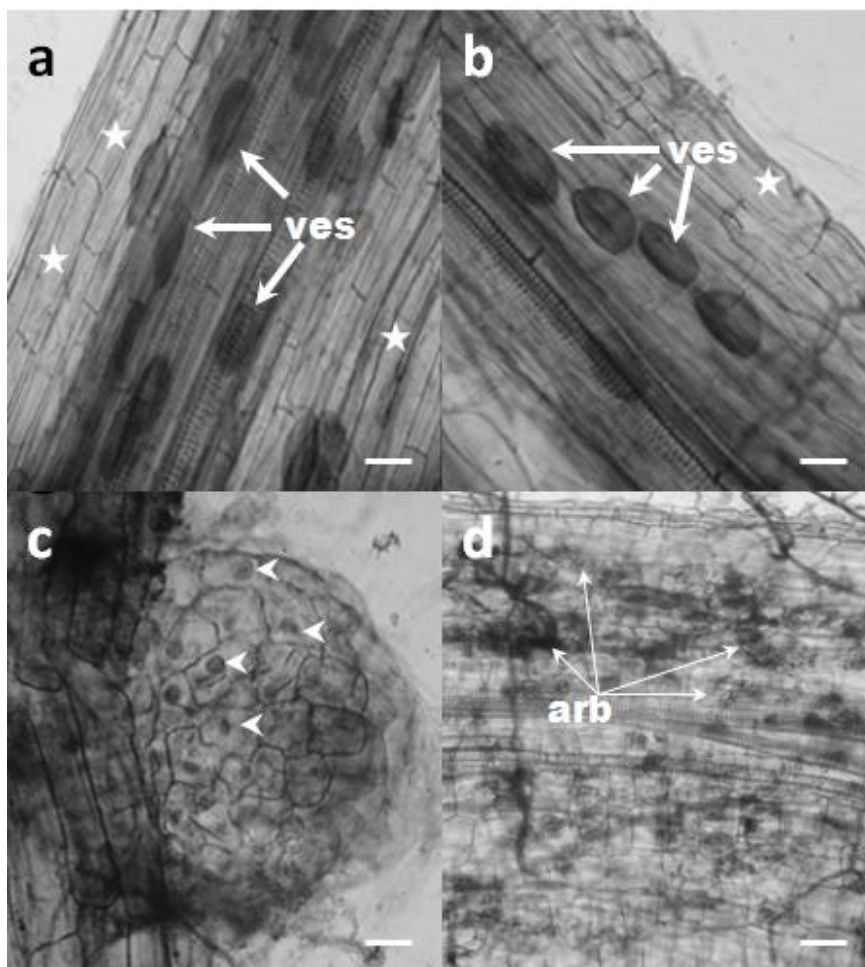


Figura 6. Micrografia óptica nas raízes de plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* superexpressando a H^+ -PPase, colonizada pelo FMA *G. intraradices*, mostrando: (a) e (b) Vesículas (ves) e alongamento celular (estrela), bars = 50 μ m. (c) Arbúsculos em formação (com setas) e (d) Arbúsculos (arb), bar = 50 μ m.

A colonização micorrízica nas raízes de *AVPIOX*, inoculadas com *G.intraradices* (*AVPIOX+Gi*), mostraram elevado o número de vesículas, situados ao longo do parênquima cortical (Figura 6a e Figura 6b), seguido pela presença de arbúsculos em determinadas regiões da raiz (Figura 6d e Figura 7e), inúmeras hifas asseptadas (Figura 7c), esporos (Figura 7b) e evidências de alongamento celular (Figuras 6a, Figura 6b e Figura 7d).

Uma hipótese para explicar tal evidência (Figuras 6a, Figura 6b e Figura 7d), está no efeito da auxina na promoção do alongamento celular, conhecida como “hipótese do crescimento ácido”. Esta hipótese estabelece que a auxina proporcione um aumento no efluxo de H^+ , com conseqüente queda no pH do apoplasto. Isto ativa inicialmente as expansinas que atuam quebrando as pontes de hidrogênio das ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses (Swarup *et al.*, 2007; Cleland, 2010). Logo após, outras enzimas são ativadas (hidrolases, pectinases, celulasas e hemicelulasas) que podem atuar sobre os

componentes da parede celular, provocando seu afrouxamento e aumentando sua extensibilidade.

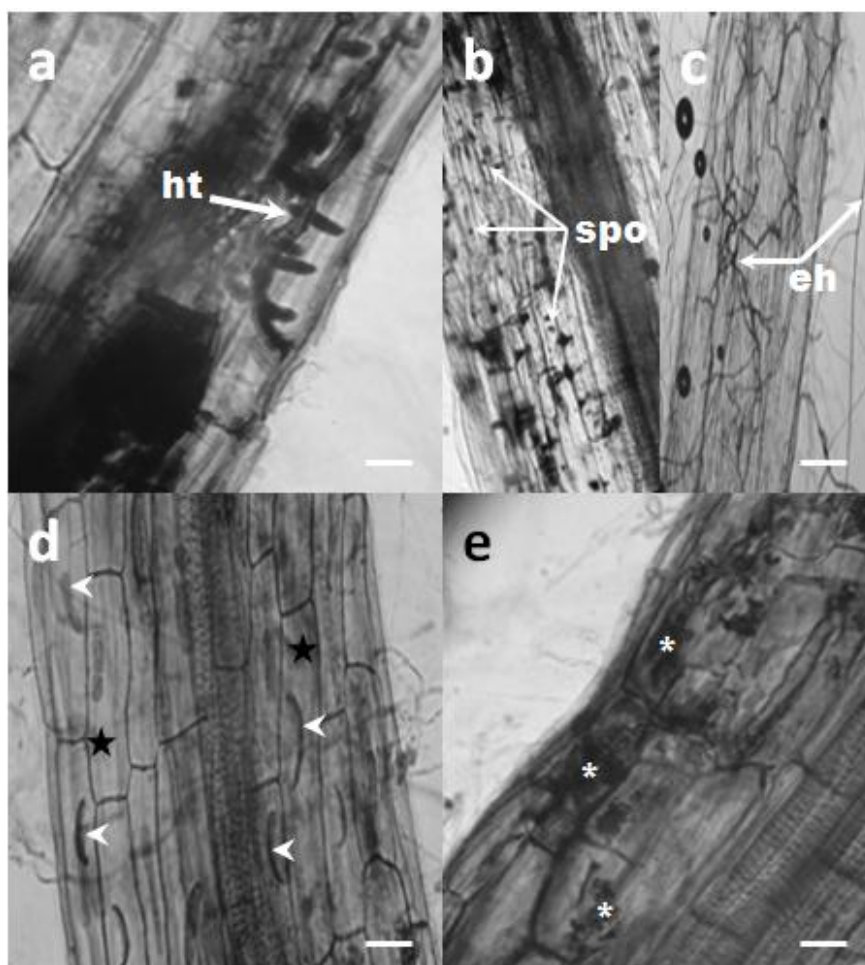


Figura 7. Micrografia óptica nas raízes de plantas transgênicas de tomateiro *AVPIOX* superexpressando a H^+ -PPase, colonizada pelo FMA *G. intraradices*, mostrando: (a) Hifa grossa (ht), bar = 50 μ m. (b) Esporos (spo), bar = 50 μ m. (c) Hifa externa (eh), bar = 50 μ m. (d) Arbúsculos abortadados (com setas) e alongamento celular (estrela), (e) Arbúsculos (asterísco), bar = 50 μ m.

Entretanto, de acordo com esta hipótese, a auxina poderia aumentar a taxa de efluxo de H^+ através da membrana plasmática agindo sobre os seguintes processos: aumentando a atividade da H^+ -ATPase ou aumentando a síntese da H^+ -ATPase. Resultados similares foram encontrados em *Arabidopsis thaliana* (Swarup *et al.*, 2007). Com base nos resultados encontrados neste trabalho (Figura 6a, Figura 6b e Figura 7d), aos de Swarup *et al.*, (2007) e Cleland, (2010), sugerimos que a partir do aumento no estímulo da biossíntese da auxina em raízes de *AVPIOX*, devido a sua superexpressão da H^+ -PPase (Gaxiola *et al.*, 2007), resultem em significativos alongamentos celulares, comprovados neste trabalho

(Figuras 6a, Figura 6b e Figura 7d). Nas raízes laterais de *AVPIOX* observamos arbúsculos em formação, ao longo do parênquima (Figura 6c), demonstrando que a colonização ocorre em períodos iniciais de formação do córtex radicular.

Entretanto, comportamentos não usuais (efeitos negativos de micorrização ou resistências de colonização), também foram observados nestas raízes de *AVPIOX*, como o engrossamento das hifas asseptadas do fungo simbiote (Figura 7a) e presença de arbúsculos abortados (Figura 7d) incapazes de estabelecimentos normais de colonização. Os resultados aqui apresentados (Figura 7a e Figura 7d), estão de acordo com os estudos de David-Schwartz *et al.*, (2001).

Os mesmos autores também evidenciaram em tomateiro GM *Lycopersicon esculentum*, Micro-Tom, gene *MI61*, tais resistências (efeitos negativos de micorrização) de colonização, na presença de esporos *Glomus intraradices*. Foi também revelado resistências à micorrização na fase pré-simbiótica e simbiótica por *Glomus mosseae* e *Gigaspora margarita*. Durante a avaliação dos estágios de pré-infecção na rizosfera do tomateiro GM, a germinação de esporos e a formação de apressório *G. intraradices* foram inferiores em 45% e 70%, respectivamente, do que as taxas obtidas com as plantas do tipo selvagem. Entretanto estes resultados revelaram a ação de mecanismos genéticos do tomateiro GM, controlando o processo de colonização pelos FMAs e reduzindo assim, significativamente os estágios de infecção pré-micorrízicos.

Sagan *et al.*, (1995) no entanto, indicaram ainda dois tipos de genes (*myc ± 1* e *myc ± 2*) que afetaram a simbiose micorrízica em leguminosas. O mutante do tipo *myc ± 1* é encontrado em outras espécies de leguminosas, bloqueando os estágios iniciais de colonização e de formação do apressório na epiderme da raiz (Sagan *et al.*, 1995; David-Schwartz *et al.*, 2001). Já os do tipo (*myc ± 2*) são restritos aos estágios (simbióticos) posteriormente, ao desenvolvimento de vesículas, mas as primeiras fases de colonização parecem progredir normalmente (Gianinazzi-Pearson, 1996). Os papéis exatos dos genes *myc ± 1* e *myc ± 2* em plantas, ainda não foram caracterizados, mas sugerimos estar localizado em *loci* diferentes (Gianinazzi- Pearson, 1996).

No presente estudo, *AVPIOX*+Gi demonstramos alguma susceptibilidade a infecção quando colonizadas com hifas externas (Figura 7c), vesículas (Figura 6a, Figura 6b) e arbúsculos (Figura 6d). Isto sugere que as propriedades que regem os estágios pós-infecção de colonização micorrízicas são normais, tornando esta associação com *AVPIOX myc ± 2* improvável. Além disso, *AVPIOX* resistentes à colonização (Figura 7a, Figura 7d) e com engrossamento de hifas (Figura 7a), sugerem mecanismos anormais. Se um alguns tipos de

sinais estão envolvidos ou se estas respostas morfológicas são simplesmente dose-dependente e ainda precisam ser elucidados.

Adicionalmente, sugerimos à existência de mecanismos de defesa em raízes de *AVP1OX*. O primeiro é de natureza bioquímica/fisiológica como por exemplo, na produção de exsudatos radiculares e mudanças fotossintéticas foram confirmados (Sobrinho *et al.*, 2005; Rui *et al.*, 2005). Além do aparato bioquímico de resistência, as plantas podem reagir à colonização sintetizando substâncias que reforcem a parede celular devido a uma maior produção de microfibrilas e ligninas impedindo o avanço dos FMAs por um efeito puramente físico ou através de um desbalanço de citocininas (Rui *et al.*, 2005; Saldajeno *et al.*, 2008). O objetivo final desses diferentes mecanismos é evitar ou atrasar o processo de colonização dos FMAs no interior das plantas, bem como criar condições adversas para a colonização dos tecidos vegetais pelo mesmo (Labanca, 2002; Cleland, 2010).

Os resultados aqui apresentados são consistentes e adequados com a hipótese de que o FMA *G.intraradices* BEG 24 apresentem alterações morfológicas em suas hifas asseptadas durante seu processo de colonização radicular em *AVP1OX*, confirmado (Figura 7a e Figura 7d), no presente trabalho.

3.2 Respostas na atividade de enzimas do estresse oxidativo

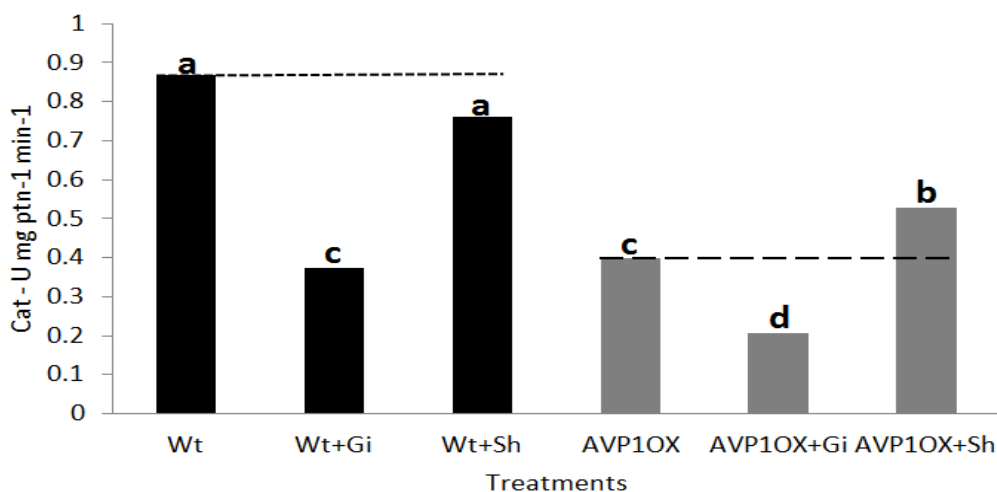


Figura 8. Atividades da enzima Catalase (CAT) em plantas transgênicas de tomateiro *AVP1OX* e tipo silvestre *Wt* inoculadas ou não com FMAs *G. intraradices* ou *S.heterogama*. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estudos recentes revelaram que os eventos bioquímicos são regulados pela interação planta-fungo (Costa e Lovato, 2011; Tian *et al.*, 2013). Neste sentido, FMAs podem proporcionar atenuações significativas nos danos oxidativos em plantas (Tian *et al.*, 2013).

Segundo Caverzan *et al.*, (2012), PGMs apresentaram alterações nas atividades enzimáticas de estresse oxidativos, confirmado (Figura 8) no presente trabalho, onde *AVPIOX* inoculadas ou não, apresentaram reduções ($P \leq 0,05$) nos níveis das atividades enzimáticas da CAT, evidenciando menor mecanismo de defesa.

Nossos estudos (Figura 8), reforçam o potencial homeostático da super-expressão da H^+ -PPase vacuolar em *AVPIOX* e portanto reduzindo o potencial de estresse oxidativo (Gaxiola *et al.*, 2007; 2013), o que foi consistente com outros estudos nas reduções significativas nas atividades enzimáticas da CAT em PGMs, como em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.-8245), através da caracterização eletroforética múltiplas, revelou reduções de até oito vezes na atividade da catalase (Kerdnaimongkol e Woodson, 1999), batata (*Solanum tuberosum* L.) (Bajji *et al.*, 2007) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Iannome *et al.*, 2010). Curiosamente, em PGMs de mandioca (*Manihot esculenta* L.), inoculadas ou não com MAs, obtiveram maiores atividades enzimáticas da CAT (Xu *et al.*, 2013).

AVPIOX inoculadas com *G. intraradices* (*AVPIOX* +Gi) (Figura 8), observaram-se reduções ($P \leq 0,05$) de 48,25% nas atividades enzimáticas da CAT em comparação ao controle *AVPIOX*. Os resultados obtidos (Figura 8), estão de acordo com Guenoune *et al.*, (2001) que relataram respostas significativamente reduzidas nas atividades enzimáticas da CAT em PGMs de alfafa (*Rhizoctonia solani*) colonizadas por *G. intraradices*. Estes resultados indicam que a colonização micorrízica por ácido jasmônico poderia ocorrer por regulação oxidativa, que ocorre de forma reduzida, sendo confirmado pelo presente trabalho (Figura 8) ($P \leq 0,05$) em raízes de plantas colonizadas por *G. Intraradices* (*AVPIOX* +Gi).

AVPIOX inoculadas com *S.heterogama* (*AVPIOX*+Sh) (Figura 8), demonstraram aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 31,75% nas atividades da CAT em relação ao controle. Entretanto, sabe-se que MAs apresentam grande promoção na metabolização de sinalizadores hormonais, confirmado neste trabalho os melhores resultados (Figura 8), onde *S.heterogama* foi o inóculo micorrízico de escolha, favorecendo maiores atividades de defesa em *AVPIOX*.

Estes resultados corroboram aos encontrados por Noctor *et al.*, (2002), que observaram reduções nas atividades da CAT em plantas GM de cevada (*Hordeum vulgare* L.), trigo (*Triticum aestivum*), batata (*Solanum tuberosum* L.), milho (*Zea mays*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*). Bor *et al.*, (2003) demonstraram que a beterraba (*Beta marítima* L.) tolerante à salinidade, apresentaram aumentos nas atividades da CAT e um melhor

mecanismo de proteção contra danos oxidativos. Com base nos resultados encontrados neste trabalho (Figura 8), aos de Noctor *et al.*, (2002) e Bor *et al.*, (2003) sugerimos que a regulação nas atividades da CAT foram reduzidas em *AVP1OX*, devido a alta superexpressão do gene da H^+ -PPase vacuolar, e conseqüentemente, maior eficiência fisiológica, bioquímica e homeostática (Gaxiola *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2011).

Nossos resultados (Figura 8) indicam ainda, que *G. intraradices* consiga superar as defesas de *AVP1OX* de forma mais eficiente do que *S.heterogama*. Tal indicação baseia-se no potencial de resposta da espécie *Glomus* spp. no hospedeiro, seja superior à espécie *Scutellospora* spp., devido à presença de vesículas com função de reserva energética e maior potencial de regulação pelo sistema de defesa vegetal (Lambais *et al.*, 2003; Stürmer *et al.*, 2013).

Paralelamente, Wt inoculadas por *G. intraradices* (Wt+Gi), obtiveram redução ($P \leq 0,05$) de 56,97% (Figura 8) quando comparados ao controle não inoculado (Wt). Respostas semelhantes têm sido relatadas na redução nas atividades da CAT em plantas silvestres com Rice-Evans *et al.*, (1991), que demonstraram efeitos não significativos nas atividades de CAT após a inoculação de *G. intraradices*.

Por outro lado, trabalhos futuros envolvendo a possível existência de genes que codificam outros sistemas antioxidantes em células radiculares de *AVP1OX* (por exemplo: SOD, APX, GSH, Prx), com FMAs, bem como os seus padrões de expressão, devem ser examinados.

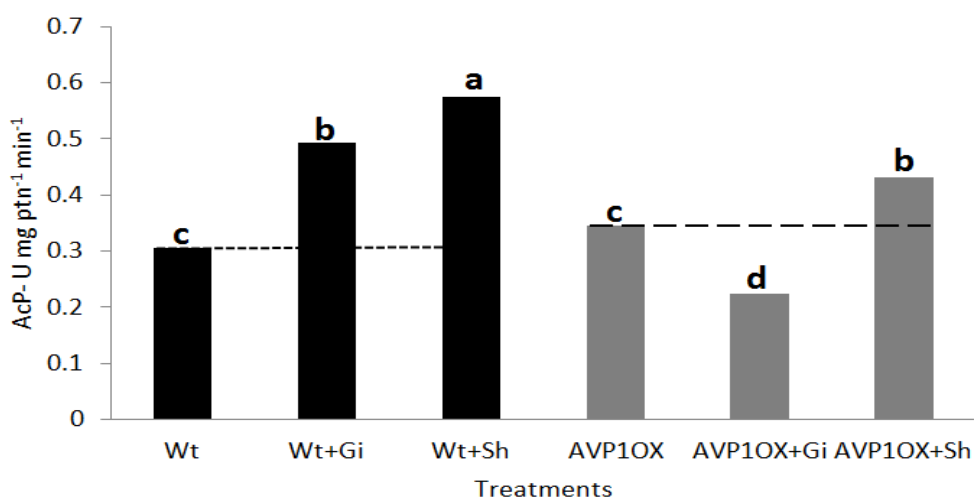


Figura 9. Atividades da enzima fosfatase ácida (AcP) em plantas transgênicas de tomateiro *AVP1OX* e tipo silvestre Wt inoculadas ou não com FMAs *G. intraradices* ou *S.heterogama*. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As fosfatases são enzimas que contribuem positivamente na maior absorção de P no solo (Lundmark *et al.*, 2011). Nesse contexto, uma etapa do processo de mineralização e ação de enzimas que hidrolisam fosfato ligados organicamente no solo, estão as AcP e AIP (Kong *et al.*, 2012). Estas são respectivamente classificadas como ácido ou alcalino, de acordo com o pH ideal para a catálise (Kong *et al.*, 2012). A AcP geralmente não são específicas. Em contraste, as AIP em plantas geralmente exibem especificidade ao substrato e desempenham funções definidas no metabolismo (Lundmark *et al.*, 2011).

Wt inoculados por *G. intraradices* (Wt+Gi), obtiveram aumentos ($P \leq 0,05$) estatisticamente significativos de 61% (Figura 9), nas atividades da AcP em relação ao seu controle Wt. Além disso, quando as mesmas inoculadas por *S.heterogama* (Wt+Sh), revelaram maior capacidade de estimulação ($P \leq 0,05$) em 88% (Figura 9).

AVPIOX inoculados por *G. intraradices* (AVPIOX+Gi), obtiveram reduções ($P \leq 0,05$) significativas de 36% (Figura 9) em relação ao controle AVPIOX. Estes dados estão de acordo com Senoo *et al.*, (2007), utilizando-se coloração histoquímica em raízes de leguminosa GM (*Lotus japonicus* - Ljsym78-2) colonizadas por *Glomus*, demonstrando reduções ($P \leq 0,05$) de 91% (Figura 9) nas atividades da AcP, em comparação ao tipo silvestre.

Entretanto, quando AVPIOX foram inoculados por *S.heterogama* (AVPIOX+Sh), obtiveram resposta inversa, promovendo aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 25% (Figura 9) e por apresentarem estatisticamente equivalentes ($P \leq 0,05$) ao silvestre inoculado (Wt+Gi) (Figura 9), favorecendo a planta de forma superior ao controle (Wt). Nossos resultados (Figura 9) revelaram estatisticamente, o grande potencial da *S.heterogama*, proporcionando maiores incrementos em tais atividades enzimáticas nas (AVPIOX+Sh) e (Wt+Sh).

Por conseguinte, respostas em AVPIOX inoculados ou não, mostraram-se menores ($P \leq 0,05$) (Figura 9) nas atividades enzimáticas da AcP, comparando-se aos Wt inoculados ou não.

Para Hammond e Branco, 2008 o que controla as expressões dos genes envolvidos na captação de P é a oscilação de açúcares e fitormônios. (i) Açúcares translocados através do floema, tem o potencial para iniciar a cascata de sinalização, que alteram a expressão de genes envolvidos resposta das plantas à baixa disponibilidade de P. (ii) Fitormônios controlam a expressão de genes envolvidos na captação de P. Entretanto as alterações na concentração local de transporte, ou a sensibilidade de auxinas, etileno e citocinina têm sido implicados na execução das respostas das plantas a rizosfera ou estado da planta de P, incluindo o desenvolvimento de pêlos radiculares, raízes laterais, embora alguns estudos fornecem resultados conflitantes (Rubio *et al.*, 2009). Análises detalhadas de estrutura do sistema

radicular em *Arabidopsis* têm sugerido que uma alteração no transporte de auxinas tem um papel importante na iniciação do primórdio laterais raiz (Nacry *et al.*, 2005).

Segundo Gaxiola *et al.*, (2007; 2013), *AVP1OX* resultam de modo geral, na elevação da cascata de sinalização de açúcares e de auxinas. Portanto, reforça-se a teoria de que as alterações nas atividades de AcP em *AVP1OX* sugerem ser meramente devido aos níveis de açúcares (Lundmark *et al.*, 2011) e fitormônios (Miura *et al.*, 2011) na formação de MAs.

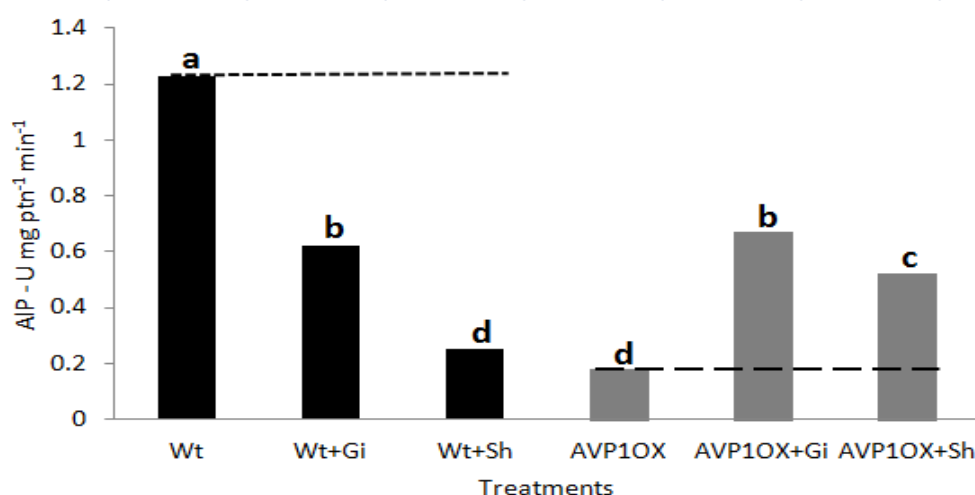


Figura 10. Atividades da enzima fosfatase alcalina (ALP) em plantas transgênicas de tomateiro *AVP1OX* e tipo silvestre Wt inoculadas ou não com FMAs *G. intraradices* ou *S.heterogama*. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A ALP é uma fosfomonoesterase de importância na mineralização do P orgânico (Po) do solo. A atividade desta enzima é um dos poucos métodos de coloração, que use a reação bioquímica, por definição no envolvimento da transformação de Po.

Wt inoculados com *G. Intraradices* (Wt+Gi), obtiveram reduções ($P \leq 0,05$) estatisticamente significativos de 49% (Figura 10) nas atividades enzimáticas da ALP em relação ao seu controle (Wt). Além disso, quando as mesmas foram inoculadas por *S. heterogama* (Wt+Sh), obtiveram reduções ($P \leq 0,05$) ainda maiores das atividades enzimáticas em 79% (Figura 10). Estes dados indicam o menor potencial de incremento pelos dois inóculos (Gi/Sh) em Wt. Nossos resultados (Figura 10) demonstram a menor ($P \leq 0,05$) contribuição enzimática das micorrizas nestas plantas.

Sabe-se que FMAs contribuem diretamente no aumento de enzimas antioxidantes em plantas, proporcionando atenuações significativamente positivas (Tian *et al.*, 2013). Os

resultados em *AVPIOX* revelaram uma resposta inversa ($P \leq 0,05$) (Figura 10). Quando as mesmas foram inoculadas por *G. Intraradices* (*AVPIOX+Gi*) obtiveram aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 272% (Figura 10) em relação ao seu controle, mas estatisticamente equivalentes ($P \leq 0,05$) ao (*Wt+Gi*) (Figura 10).

Similarmente, mas em menor grandeza ($P \leq 0,05$), aconteceu com *S. heterogama* com 189% (Figura 10). Estes resultados corroboram aos de outros autores (Tian *et al.*, 2013). Joner e Johansen, (2000) relataram que atividades da AIP em plantas de trevo (*Trifolium subterraneum L.*) obtiveram aumentos duas vezes maiores, quando inoculados com *G. intraradices*. Estes autores acreditam que esta enzima seja um bom indicador metabólico de resistência contra estresses ambientais (bióticas e abióticas). Os resultados (Figura 10) ($P \leq 0,05$) estão de acordo com Joner *et al.*, (2000), que demonstram que atividades da AIP, sirvam de bons indicadores da colonização micorrízica.

3.3. Alteração microbiana (fungos e bactérias) no rizoplane, rizosfera e solo adjacente em *Wt* e *AVPIOX* inoculados com *S.heterogama*.

De acordo com nossos resultados, através dos modelos em rizotubo (Figura 1) o compartimento (A), atribuído como rizoplane, em *Wt* e *AVPIOX*, foi observado reduções ($P \leq 0,05$) significativas e semelhantes em ambos os tratamentos, na densidade total de fungos (Figura 12a) em 21% e 17,22% e bactérias (Figura 11a) em 5% e 11% respectivamente, em relação aos controles com a presença do inóculo *S.heterogama* (*FMA+ AVPIOX*) (*FMA+Wt*).

Nesse sentido, para Bouasria *et al.*, (2012) as reduções nas densidades microbianas (fungos e bactérias) sejam devido a disponibilidade de nutrientes nos determinados compartimentos do solo, pela especificidade das interações (Millard *et al.*, 2010) e exsudatos radiculares (Zinger *et al.*, 2011). Além disso, as composições destas comunidades microbianas, respondem diretamente as alterações, devido crescimento de plantas e alocação de carbono (Bouasria *et al.*, 2012).

Com base nos resultados acima (Figura 11a e Figura 12a), acreditamos numa possível competição interespecífica por recurso entre microrganismos do solo (fungos e bactérias) e *FMA* (*S.heterogama*), essenciais ao desenvolvimento e multiplicação. Além disso, plantas sendo mediadas sobre os efeitos das alterações na comunidade microbiana, são consideradas fundamentais na elucidação das respostas nos ecossistemas em mudanças.

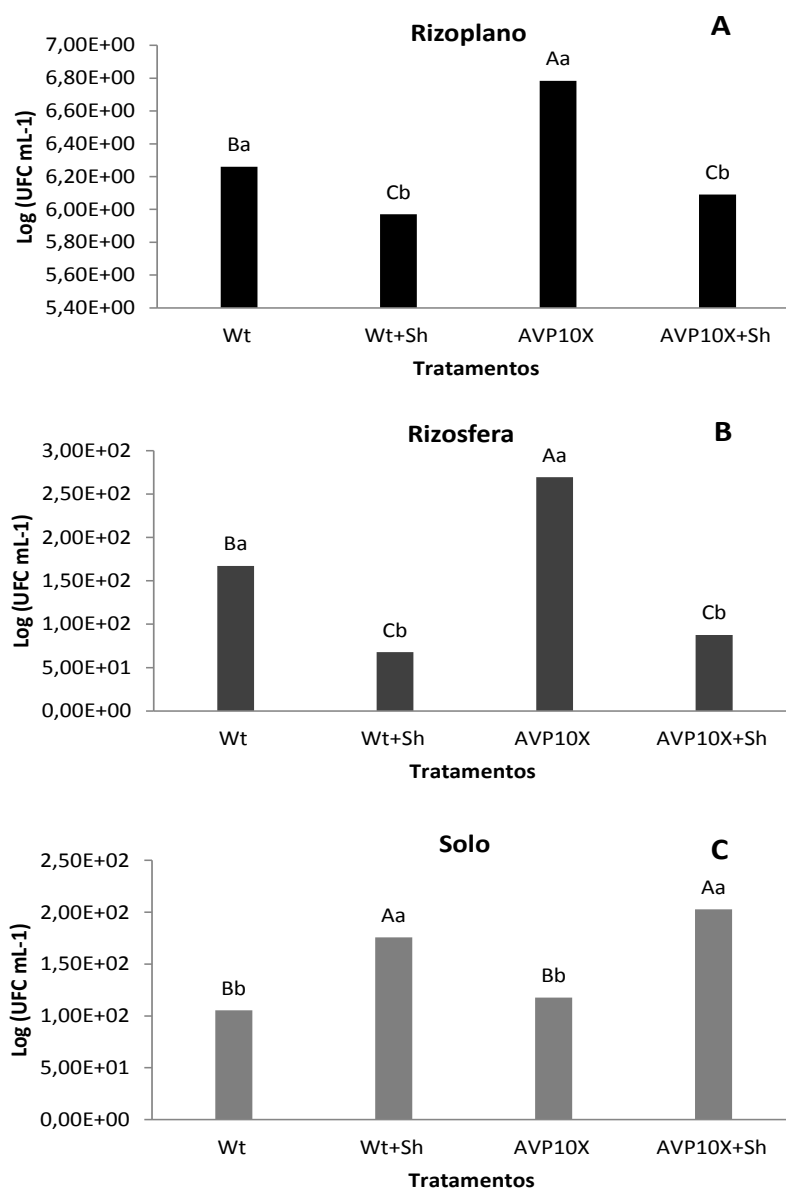


Figura 11. Distribuição na densidade total de bactérias. O compartimento (A) foi determinado como rizoplano, em plantas de tomateiro silvestre Wt e transgênicas AVP10X, inoculados ou não com FMAs *S.heterogama* (Wt/Wt+Sh/AVP10X/AVP10X+Sh). No compartimento (B) foi determinado como rizosfera em plantas de tomateiro silvestre Wt e transgênicas AVP10X, inoculados ou não com FMA *S.heterogama* (Wt/Wt+Sh/AVP10X/AVP10X+Sh). Já no compartimento (C) foi determinado como solo. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Joergensen e Witchern, (2008) e Bouasria *et al.*, (2012). Devido a intrínseca interação (rizoplano) entre plantas e

microrganismos, estas conspícuas simbioses são muito sensíveis a alterações ambientais podendo ser bióticas e abióticas (Andreote *et al.*, 2006) ou pela alteração da planta cultivada.

Bruinsma *et al.*, (2003) pesquisando os efeitos das PGMs sobre os microrganismos do solo, através de técnicas tradicionais como: número mais provável (NMP), seguida de “Pour Plate” de contagem em placas de Petri, ou de técnicas moleculares: PCR, ERIC-PCR, T-RFLP, SSCP e DGGE, demonstraram o efeito direto na composição da comunidade. Segundo os mesmos autores, o efeito de PGMs como em canola (*Brassica napus L.*), tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), alfafa (*Medicago sativa*) e batata (*Solanum tuberosum*), sobre microrganismos do solo, foram detectados variações ou tendências diferentes em extensão e intensidade.

Outros estudos demonstraram efeitos transitórios e temporários da atividade enzimática no solo e da estrutura bacteriana associada à rizosfera (Rasche *et al.*, 2006), ou efeitos variáveis entre os estágios de desenvolvimento da planta, como demonstrado para estrutura de perfis da comunidade bacteriana por Milling *et al.*, (2004).

Os resultados (Figura 11a) evidenciam aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 15,22% na densidade total de bactérias em compartimento (B), denominado rizoplano em AVPIOX em comparação com controle Wt.

Nesse sentido, segundo trabalho de Somers *et al.*, (2004), na composição dos exsudatos, variaram com a espécie e estágio de crescimento da planta e que em suas diferentes fases altera qualitativa e quantitativamente a abundância da comunidade microbiana na grande proximidade da raiz.

Oger *et al.*, (2002) compararam plantas modificadas (*Lotus corniculatus*) na produção de opinas e selvagens (*Lotus corniculatus cv.*) em casa-de-vegetação. Segundo o mesmos autores, depois de 20 semanas, a contagem de bactérias totais em plantas transgênicas foram superiores em até 475 vezes na superfície das raízes em relação à controle silvestre. Entretanto, quando plantas transgênicas foram substituídas por controles, os números destas bactérias reduziram drasticamente.

Alguns estudos relataram que as comunidades bacterianas são claramente alteradas por plantas transgênicas (Lee, *et al.*, 2011). Em contraste, outros estudos demonstraram que as mudanças estatisticamente não significativas (Dunfield e Germida, 2004).

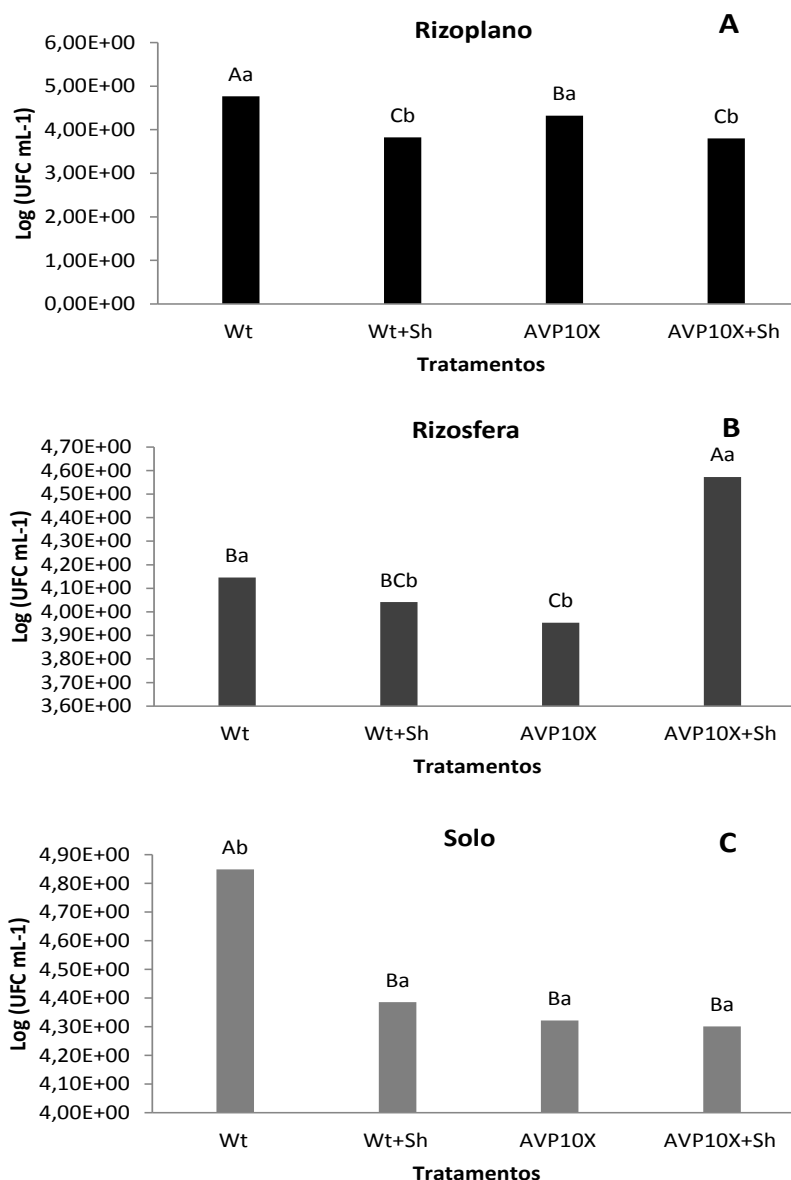


Figura 12. Distribuição na densidade total de fungos. O compartimento (A) foi determinado como rizoplano, em plantas de tomateiro silvestre Wt e transgênicas *AVP10X*, inoculados ou não com FMAs *S.heterogama* (Wt/Wt+Sh/*AVP10X*/*AVP10X*+Sh). No compartimento (B) foi determinado como rizosfera em plantas de tomateiro silvestre Wt e transgênicas *AVP10X*, inoculados ou não com FMA *S.heterogama* (Wt/Wt+Sh/*AVP10X*/*AVP10X*+Sh). Já no compartimento (C) foi determinado como solo. Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados deste trabalho (Figura 12) demonstram reduções ($P \leq 0,05$) nas populações de fungos no rizoplano, rizosfera do solo em *AVP10X*. Por outro lado, os números de bactérias no rizoplano e na rizosfera destas plantas, obtiveram significativos

aumentos ($P \leq 0,05$), mas inversamente ($P \leq 0,05$) quando inoculadas com *S.heterogama* (AVPIOX+FMA) (Figura 11a,b).

Lugtenberg e Kamilova, (2009) afirmaram que a concentração bacteriana no rizoplano, se apresenta de 10 a 1000 vezes maior que no restante do solo. Berg, (2009) relata que no rizoplano, efeitos benéficos exercidos pelas bactérias associadas às plantas são realizados por meio do estímulo ao crescimento da planta ou por proteção microbiológica. Já Compant *et al.*, (2010) observaram, que também são encontradas bactérias neutras, e as que apresentam interação negativa com as plantas, como fitopatógenos.

Através do rizotubo (Figura 1) no compartimento (B), atribuído como rizosfera, em Wt e AVPIOX, foram observados comportamentos diferenciados entre os microrganismos do solo. Para a densidade total de fungos (Figura 12b) em Wt inoculadas ou não, foram observados reduções ($P \leq 0,05$) significativas e semelhantes, em ambos os tratamentos. Paralelamente, mas de forma inversa em AVPIOX observou-se grande aumento ($P \leq 0,05$) destas plantas submetidas à inoculação de *S.heterogama* (Sh+AVPIOX). As mudanças nos padrões da comunidade de fungos, provavelmente ocorrem por causa da mudança de morfologia radicular (Gaxiola *et al.*, 2007) e nos padrões de exsudação durante o desenvolvimento das plantas (Brimecombe *et al.*, 2001). A liberação de substâncias orgânicas pelas raízes das plantas tem um aspecto ecológico interessante, uma vez que influem a disponibilidade de nutrientes na rizosfera e indiretamente, atua sobre os microrganismos do solo, que por sua vez influênciam o crescimento das plantas (Yang e Crowley, 2000).

A (Figura 11b) revelou que para densidade total de bactérias, obtiveram reduções ($P \leq 0,05$) significativas em Wt e AVPIOX na presença do inóculo *S.heterogama* (FMA+Wt) (FMA+AVPIOX). Evidenciamos aumentos ($P \leq 0,05$) acentuados e significativos em AVPIOX.

Para Milling *et al.*, (2004) PGMs têm exsudatos alterados e são interessantes sistemas modelos para estudar efeitos específicos da transgenia no metabolismo radicular e ecologia da rizosfera.

Resultados similares foram observados por Donegan *et al.*, (1995) avaliando PGMs em dois híbridos de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), observaram um aumento de bactérias totais em solo rizosférico. Rui *et al.*, (2005) relataram maiores números de bactérias funcionais em algodão GM (*Gossypium hirsutum*) em solo rizosférico. Devare *et al.*, (2004) observaram em plantas de milho (*Zea mays* L.) Bt-cry3Bb alterações significativas nas comunidades bacterianas em solo rizosférico.

Yang e Crowley, 2000 em estudos com PGMs de mamão (*Carica papaya* L.) resistente a vírus, observaram aumentos significativos nos números de bactérias em solo rizosférico.

De acordo com o rizotubo (Figura 1) e compartimento (C), atribuído como solo adjacente, em Wt e *AVPIOX*, foram observados comportamentos diferenciados em microrganismos do solo.

Para a densidade total de fungos (Figura 12c) em Wt não inoculados, obtiveram aumentos ($P \leq 0,05$) significativos de 11% em relação às mesmas inoculadas com *S.heterogama* (Wt+FMA).

Paralelamente, mas de forma inversa em *AVPIOX* inoculadas ou não (*AVPIOX*) (*AVPIOX*+FMA), obtiveram reduções ($P \leq 0,05$) significativas e estatisticamente semelhantes. Estes dados denotam respostas diferenciadas de comunidades microbianas (fungos e bactérias) em diferentes hospedeiros, possivelmente relacionados aos níveis fisiológicos, bioquímicos e bioenergéticos (Ramos *et al.*, 2011; Gaxiola *et al.*, 2013). Tais resultados estão de acordo com Bouasria *et al.*, (2012).

Já para densidade total de bactérias (Figura 11c) obtiveram respostas inversas de maneira geral em todos os tratamentos inoculados ou não, em comparação com as mesmas em solo rizosférico (Figura 11b); onde Wt e *AVPIOX* inoculadas com *S.heterogama* (Figura 11c), obtiveram aumentos ($P \leq 0,05$) significativos e semelhantes, de aproximadamente 90% para ambos os tratamentos, em comparação com os tratamentos controles.

4. Conclusões

A colonização micorrízica em *AVPIOX* inoculadas por *G.intraradices* (*AVPIOX+Gi*) aumentou em 17% em comparação com *Wt* inoculadas pelo mesmo FMA (*Wt+Gi*), indicando que o gênero *Glomus* devido à presença de vesículas, tenha potencial de resposta no hospedeiro superior à espécie *Scutellospora* spp. *AVPIOX* inoculados com *G.intraradices* mostrou evidências de alongamento celular, indicando estar relacionado o aumento no estímulo da biossíntese de auxina em raízes de *AVPIOX*, devido a sua superexpressão da H^+ -PPase.

G. intraradices mostrou habilidade em modificar-se morfológicamente, através do engrossamento de suas hifas, em raízes de *AVPIOX*, indicando estar envolvidos por mecanismos de resistências (genéticos) e defesas de natureza bioquímica, por exemplo, na produção de exsudatos radiculares e física na produção de microfibrilas, ligninas e desbalanço de citocininas e fisiológica como mudanças fotossintéticas.

AVPIOX inoculadas ou não, apresentou baixos níveis nas atividades enzimáticas da CAT, evidenciando menor mecanismo de defesa. O resultado reforça o potencial homeostático da super-expressão da H^+ -PPase vacuolar em *AVPIOX* e portanto reduzindo o potencial de estresse oxidativo. A atividade AcP nestas plantas inoculadas ou não, também mostrou-se reduzida, mas inversamente e com maior grandeza a AIP, demonstrando que esta sirva como indicador de colonização micorrízica. *S.heterogama* é o inóculo micorrízico que mais favoreceu as atividades de defesa do estresse oxidativo em *AVPIOX*, revelando um caráter “biorregulador”, suplementando a atenuação nas atividades bioquímicas.

As atividades microbianas sofreram reduções gradativas e flutuações ao longo dos compartimentos (rizoplano/rizosfera/solo adjacente), respectivamente em *AVPIOX*, demonstrando assim, alterações diretas dos exsudatos radiculares na distribuição na densidade total de fungos e bactérias, relacionando-os as suas distâncias a partir da raiz. Para distribuição na densidade de fungos, houve aumento quando inoculados pela *S.heterogama* em solo rizosférico e inversamente para bactérias, obtendo-se maior aumento quando não inoculado. *AVPIOX* favoreceu significativamente a densidade total de fungos que bactérias e as mesmas quando inoculadas, responderam de forma invertida.

5. Agradecimentos

À Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota – (CICG), coordenado pelo professor Dr. Sidney Luiz Stürmer, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, Brasil, por ter concedido gentilmente o inóculo *Scutellospora heterogama* PNB 102 A. Ao *Bank Exchange of Glomales* (BEG, Dijon- França) por ter concedido o inóculo *Glomus intraradices* BEG 24. À Universidade Vila Velha (UVV), através do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, pela bolsa (AP- artigo 84/Lei nº 9.394/96, 71, §§ 1º e 2º - UVV) do Mestrado de Carlos Moacir Colodete. Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LMAB), pelo apoio à pesquisa e por disponibilizar suas estruturas e equipamentos no desenvolvimento deste trabalho. Ao orientador e professor Dr. Alessandro Coutinho Ramos, pelas valiosas sugestões e revisões deste artigo científico.

6. Referências

- Andreote, F.D., Rocha, U.N., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., van Overbeek, L.S. 2006. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). Springer-Verlag. 97(4), 389–399.
- Barred, A.J. 1972. Lysosomal enzymes. In: Dingle, J.T. (Ed.), Lysosomes: A Laboratory Handbook. North-Holland. Amsterdam. 33, 46-135.
- Berg, G. 2009. Plant microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology Biotechnology. 84, 11–18.
- Beutler, E. 1975. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 2ed. London. Grune e Stratton. 34, 45-55.
- Bouasria, A., Mustafa, T., De Bello, F., Zinger, L., Lemperiere, G., Geremia, R.A., Choler, P. 2012. Changes in root associated microbial communities are determined by species-specific plant growth responses to stress and disturbance. Europ.J.S.Biol. 52, 59-66.
- Brimecombe, M.J.F.A., Lelj, J.M. 2001. The Effect of Root Exudates on Rhizosphere Microbial Populations. In: R Pinton; Z. Varanini e P. Nannipieri (eds.). The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil Plant Interface. Marcel Dekker. 12, 95-140.
- Bruinsma, M., Kowalchuk, G.A., Van Veen, J.A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. Biology and Fertility of Soils. Berlin. 37, 329-337.
- Bor, M., Özdemir F., Türkan I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. 164, 77-84.
- Clark, J. 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 23, 458-460.

Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W, Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*. 35(4), 1011-1019.

Compant, S., Clement, S., Sessitsch, A. 2010. Plant growth promoting bacteria in the rhizobium and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology e Biochemistry*. 30, 669-678.

Chaparro, J.M., Badri, D.V., Bakker, M.G., Sugiyama, A., Manter, D.K., Vivanco, J.M. 2013. Root Exudation of Phytochemicals in *Arabidopsis* Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. *Plos One*. 8(2), 55731- 55735.

Cleland, R.E., Rayle, D.L. 2010. The acid growth theory of auxin induced cell elongations is alive and well. *Plant Physiology*. 99, 1271-1274.

Costa, M.D., Lovato, P.E. 2011. Micorrizas arbusculares e a supressão de patógenos. In: Klauberg-Filho, O. Mafra, A.L., Gatiboni, L.C. Tópicos em ciência do solo. Viçosa. MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 6, 119-139.

David-Schwartz, R., Badani, H., Smadar, W., Levy, A.A., Galili, G., Kapulnik, Y. 2001. Identification of a novel genetically controlled step in mycorrhizal colonization: plant resistance to infection by fungal spores but not extra radical hyphae. *Plant Journal*. 27(6), 561-569.

Devare, M.H., Jones, C.M., Thies, J.E. 2004. Effect of *Cry3Bb* transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity and diversity. *J. Environ Qual*. 33, 837-843.

Dunfield, K.E., Germida, J.J. 2004. Impact of genetically modified crops on soil and plant associated microbial communities. *Journal of Environmental Quality*. 33, 806-815.

Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. 2000. Modulation of host defense systems. In: Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and

Function. eds Kapulnik Y, D.D., Douds, J. Y. Kluwer Academic Press. Dordrecht. The Netherlands. 24, 173–200.

Donegan, K.K., Palm, C.J., Fieland, V.J., Porteous, L.A., Ganio, L.M., Schaller, D.L., Bucao, L.Q., Seidler, R.J. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl Soil Ecol.* 2, 111–124.

Euclides, R.F. 1983. Sistema de análises estatísticas e genéticas Saeg. Central de Processamento de Dados. 68, 34-37.

Feijó, J.A., Costa, S.S., Prado, A.M., Becker, J.D., Certal, A.C. 2004. Signalling by tips. *Current Opinion in Plant Biology.* 7, 589-598.

Fließbach, A., Messmer, M., Nietlispach, B., Infante, V., Mäder, P. 2012. Effects of conventionally bred and *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) maize varieties on soil microbial biomass and activity. *Biol Fertil Soils.* 48, 315–324.

Fredslund, L., Ekelund, F., Jacobsen, C., Johnsen, K. 2001. Development and Application of a Most Probable Number PCR Assay To Quantify Flagellate Populations in Soil Samples. 67, 1613-1618.

Gaxiola, R.A., Palmgren, M.G., Schumacher, K. 2007. Plant proton pumps. *Febs Letters.* 581, 2204-2214.

Gaxiola, R.A., Paez-Valencia, J., Sanchez-Lares, J., Marsh, E., Dorneles, L.T., Santos, M.P., Sanchez, D., Winter, A., Murphy, S., Cox, J., Trzaska, M., Metler, J., Kozic, A., Façanha, A.R., Schachtman, D., Sanchez, C.A. 2013. Enhanced Proton Translocating Pyrophosphatase activity Improves Nitrogen. *Eff. Rom. Lett.* 161, 1557-1569.

Guenome, D., Galili, S., Philips, D.A., Volpin, H., Chet, I., Okon, Y., Kapulnik A. 2001. The defense response elicited by the pathogen *Rhizoctonia solani* is suppressed by colonization of the AM fungus *Glomus intraradices*. *Plant Sci.* 160, 925-932.

Grace, C., Stribley, D.P. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*. 95, 1160-1162.

Giovannetti, M., Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*. 84, 489-500.

Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the root of the symbiosis. *Plant Cell*. 8, 1871-1883.

Hammond, J.P., Branco, J. 2008. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* 59, 93-109.

Iannone, M.F., Rosales, E.P., Groppa, M.D., Benavides, M.P. 2010. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. *Protoplasma*. 245, 15-27.

ISAAA-Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications>>. Acesso em: 21 de Fev. de 2013.

Joner, E.J., Aarle van, M.I., Vosatka, M. 2000. Phosphatase activity of extra radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil*. 226, 199-210.

Joner, E.J., Johansen, A. 2000. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.* 104, 81-86.

Jorgensen, H., Witchern, A. 2008. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology*. 36, 42-48.

Kerdnaimongkol, K., Woodson, W.R. 1999. Inhibition of catalase by antisense RNA increase susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124, 330-336.

Koske, R.E., Gemma, J.N. 1989. VA mycorrhizal inoculation of Hawaiian plants: a conservation technique for endangered tropical species. *Pacific Science*. 49, 181–191.

Kong, X., Wang, S., Jiang, H., Nie, G., Li, X. 2012. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*. *Toxicology*. 210, 119-125.

Latef, A.A.H.A., Chaoxing, H. 2011. Arbuscular mycorrhizal influence on growth, photosynthetic pigments, osmotic adjustment and oxidative stress in tomato plants subjected to low temperature stress. *Journal Acta Physiol Plant*. 33, 1217-1225.

Lambais, M.R., Rios-Ruiz, W.F., Andrade, R.M. 2003. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. Oxford. 160, 421-428.

Labanca, E.R.G. 2002. Purificação parcial de eliciadores presentes em (*Sccharomyces cerevisiae*): atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e a síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 118. Dissertação Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. SP, 45p.

Lee, Y.E., Rosenbrough, N.J., Farr, A. 2011. Effects of field-grown genetically modified zoysia grass on bacterial community structure. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21, 333–340.

LeBlanc, P.M., Hamelin, R., C., Filion, M. 2007. Alteration of soil rhizosphere communities following genetic transformation of white spruce. *Appl. Environ. Microbiol*. 73, 4128–4134.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem*. 193, 265-275.

Lundmark, M.T., Nilsson, L., Kørner, C.J., Nielsen, T.H. 2011. Overexpression of the MYB-related transcription factor *GCC7* in *Arabidopsis thaliana* leads to increased levels of P_i and changed P-dependent gene regulation. *Funct Plant Biol*. 38, 151-162.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Annual Review of Microbiology. 63, 541-556.

Madhusudhan, R., Ishikawa, T., Sawa, Y., Shigeoka S., Shibata, H. 2003. Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco *BY-2* cells. Physiologia Plantarum. 117, 550-557.

Millard, A.D., Zwirgmaier, K., Downey, M.J., Mann, N.H., Scanlan, D.J. 2010. Comparative genomics of marine cyanomyoviruses reveals the widespread occurrence of *Synechococcus* host genes localized to a hyperplastic region: implications for mechanisms of cyanophage evolution. Environ Microbiol. 11, 2370–2387.

Miura, K., Lee, J., Gong, Q., Ma, S., Jin, J.B., Yoo, C.Y., Miura, T., Sato, A., Bohnert, H.J., Hasegawa, P.M. 2011. *SIZ1* regulation of phosphate starvation induced root architecture remodeling involves the control of auxin accumulation. Plant Physiol. 155, 1000-1012.

Milling, A., Smalla, K., Maidl, F.X., Schloter, M., Munch, J.C. 2004. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. Plant and Soil. 266, 23-39.

Morsomme, P., Boutry, M. 2000. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta. 1465, 1-16.

Nacry, P., Canivenc, G., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., Doumas, P. 2005. A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 138, 2061-2074.

Neal, A.L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Ton, J. 2012. Benzoxazinoids in Root Exudates of Maize Attract *Pseudomonas putida* to the Rhizosphere. Plos One. 7, 35498-35501.

Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S.D., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H. 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration. Ann. Bot. 89, 841–850.

Oger, P., Mansouri, H., Dessaux, Y. 2002. Effect of rotation and soil cover on alteration of the soil microflora generated by the culture of transgenic plants producing opines. *Molecular Ecology*. Oxford. 9, 881-890.

Ramos, A.C., Façanha, A.R., Feijó, J.A. 2008a. Proton (H⁺) flux signature of the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 178, 177-88.

Ramos, A.C., Okorokova-Façanha, A.L., Canellas, L.P., Façanha, A.R. 2008c. Molecular mechanisms of the plant growth promotion and biocontrol by humic substances and soil microorganisms In: *Text Book on Molecular Biotechnology* ed. New Delhi, Mumbai, Bangalor. International Publishing House Pvt. Ltda. 24, 59-69.

Ramos, A.C., Façanha, A.R., Palma, L.M., Okorokov, L.A., Cruz, Z.M.A., Silva, A.G., Siqueira, A.F., Bertolazi, A.A., Canton, G.C., Melo, J., Santos, W.O., Schimitberger, V.M.B., Okorokova-Façanha, A.L. 2011. An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz. J. Plant Physiol.* 23, 79-89.

Rasche, D., Rinaldi, P.C., Young, R.F., Tronnier, V.M. 2006. Deep brain stimulation for the treatment of various chronic pain syndromes. *Neurosurgical Focus*. 23, 21:E8.

Rea, P.A., Poole, R.J. 1992. Vacuolar H⁺-Translocating Pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 44, 157-180.

Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. 1991. *Techniques in free radical research*, Elsevier. Amsterdam. 33, 234-244.

Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M.B., Galle, A., Kim, T.H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., Rodriguez, P.L. 2009. Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* 150, 1345–1355.

Rui, Y.K., Yi, G.X., Zhao, J., Wang, B.M., Li, Z.H., Zhai, Z.X., He, Z.P. 2005. Changes of *Bt* toxin in the rhizosphere of transgenic *Bt* cotton and its influence on soil functional bacteria. *World J. Microbiol Biotechnol.* 21, 1279–1284.

- Saldajeno, M.G., Chandanie, W.A., Kubota, M., Hyakumachi, M. 2008. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. In: Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K, eds. Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry. The Netherlands. Springer. 23, 211-226.
- Senoo, K., Solaiman, Z., Tanaka, S., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Akao, S., Tanaka, A., Obata, H. 2007. Isolation and characterization of arbuscules from roots of an increased-arbuscule-forming mutant of *Lotus japonicus*. *Annals of Botany*. 100(7), 1599-1603.
- Sagan, M., Morandi, D., Tarengi, E., Duc, G. 1995. Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after g-ray mutagenesis. *Plant Sci*. 111, 63-71.
- Silveira, S.V., Souza, P.V.D., Koller, O. C. 2002. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de abacateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37, 303–309.
- Song, H., Yan, Y.L., Titus, T., He, X., Postlethwait, J.H. 2011. The role of *stat1b* in zebrafish hematopoiesis. *Jornal Mech. Dev*. 128, 442-56.
- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. 30, 205-240.
- Shaul, O., David, R., Sinvani, G., Ginzberg, I., Wininger, S., Ovdad, N., Kapulnik, Y. 2000. Plant defense responses during arbuscular mycorrhizal symbiosis. in *Current Advances in Mycorrhizae Research*. eds Podial GK, Douds DD. APS Press. St. Paul. 56, 61–68.
- Stürmer, S. L., Sturmer, R., Pasqualini, D. 2013. Taxonomic diversity and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi (*Phylum Glomeromycota*) in three maritime sand dunes in Santa Catarina state, south Brazil. *Fungal ecology*. 6, 27-36.
- Sobrinho, C.T., Viana, F.M.P., Santos, A.A. 2005. Doenças fúngicas e bacterianas. In: Freire-Filho, F.R., Lima, J.A.A., Ribeiro, V.Q. (Eds.). *Feijão-caupi: Avanços tecnológicos*. Teresina. Embrapa Meio Norte. 34, 463-484.

Swarup, V.J., Ghosh, S., Ghosh, A., Saxena, A. 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of *Japanese encephalitis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3367-3370.

Tian, Y., Li, T., Sun, M., Wan, D., Li, Q., Li, P., Zhang, Z.C., Han, J., Xie, W. 2013. Neurexin Regulates Visual Function via Mediating Retinoid Transport to Promote Rhodopsin Maturation. *Neuron.* 77(2), 311-322.

Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A., Boller, T. 1995. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ Microbiol.* 61, 3031–3034.

Yang, C.H., Crowley, D.E., Menge, J.A. 2000. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. 35, 129-136.

Xu, K., Guisheng, Z., Xiaowei, Z. 2013. Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science.* 339, 452-456.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M. 2011. Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *Plos One.* 6(9), 24570-24578.