

**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE  
ECOSSISTEMAS**

**Dissertação de Mestrado**

**RESPOSTAS DE PLANTAS DE TOMATE  
(*Solanum lycopersicum* L.) COM SUPEREXPRESSÃO DA H<sup>+</sup>-  
PIROFOSFATASE À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES**

**VANESSA BASTOS ROSA DELL SANTO**

**VILA VELHA-ES  
MARÇO DE 2011**



**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE  
ECOSSISTEMAS**

*Dissertação de Mestrado*

**RESPOSTAS DE PLANTAS DE TOMATE  
(*Solanum lycopersicum* L.) COM SUPEREXPRESSÃO DA H<sup>+</sup>-  
PIROFOSFATASE À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES**

*Dissertação apresentada ao Centro  
Universitário Vila Velha, como pré-  
requisito do Programa de Pós-graduação  
em Ecologia de Ecossistemas, para a  
obtenção do título de Mestre em Ecologia.*

**VANESSA BASTOS ROSA DELL SANTO**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos**

**CENTRO UNIVERSITÁRIO VILA VELHA (UVV)  
VILA VELHA  
MARÇO DE 2011**

***Dissertação de Mestrado***

**RESPOSTAS DE PLANTAS DE TOMATE  
(*Solanum lycopersicum L.*) COM SUPEREXPRESSÃO DA H<sup>+</sup>-  
PIROFOSFATASE À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES**

**VANESSA BASTOS ROSA DELL SANTO**

Aprovada em 31 de Março de 2011.

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Alexandre Gomes Fontes– IFES/Campus Itapina  
Membro Externo**

---

**Prof. Dr. Leonardo Barros Dobbss – UVV/ES  
Membro Interno**

---

**Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos – UVV/ES  
(Orientador)**

"Não pode haver nenhuma paz dentro sem verdadeiro conhecimento".  
(Mahatma Gandhi)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus soberano e onipotente, presente em todos os momentos.

Aos amigos de sentimento e ideal pelo profundo amparo e enorme carinho.

A minha família em especial aos meus pais Altino e Walkyria excepcionalmente presentes em toda jornada desta minha vida.

Ao orientador pela maneira de fazer entender que temos forças individuais que já nos basta. Pelo apoio, confiança e alegria imensa de sempre. Será eterna sua terna participação em minha vida. Jamais poderia imaginar o quanto de conhecimentos poderia adquirir.

À FAPES (Fundação de Amparo e Pesquisa do Espírito santo) pela bolsa de estudos fundamental para conclusão deste projeto que também é de vida.

Aos queridos filhos e esposo pela compreensão da ausência e constante apoio, demonstrando pela forma de buscar estudar como expressão de exemplo.

Ao amigo forte e maravilhoso Arthur pelos ensinamentos, conselhos, dicas, paciência, companheirismo e apoio. Esteja feliz onde for.

A todos os companheiros e estagiários do LMAB pela alegria e disposição sempre presentes.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1. Importância da simbiose micorrízica.....	15
2.2. Exsudação radicular em plantas micorrizadas.....	17
2.3. Perspectiva ecofisiológica da enoculação de mutantes com supressão da H <sup>+</sup> -PPASE vacuolar.....	19
OBJETIVO.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Material biológico: inóculo dos fungos micorrízicos arbusculares.....	23
4.2. Obtenção, esterilização e taxa de germinação das sementes.....	24
4.3. Parâmetros de crescimento.....	24
4.4. Determinação da taxa de colonização micorrízica.....	25
4.5. Contagem da população microbiana.....	25
4.6. Avaliação das enzimas oxidativas.....	26
4.6.1. Catalase (CAT E.C. 1.11.1.6).....	26
4.6.2. Fosfatase Ácida (ACP E.C. 3.1.3.2).....	26
4.6.3. Fosfatase Alcalina (ALP E.C.3.13.1).....	26
4.7. Análise Estatística de Dados.....	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Efeito da inoculação de mutantes AVP1OX em condições de limitação nutricional (P-N-Ca-K-Mg).....	28
5.2. Colonização micorrízica.....	29
5.3. Acúmulo de macronutrientes sob condições de stress.....	35
5.4 Respostas de Colonização e Crescimento dos mutantes AVP1OX aos tratamentos microbiológicos.....	36
5.5. Efeito da inoculação de mutantes AVP1OX sob produtividade em condições de normais de nutrição.....	39
5.6. Respostas na atividade de enzimas de estresse oxidativo em mutantes AVP1OX inoculados com FMAs.....	41
5.7. Contagem da População mediana de fungos e bactérias na rizosfera de plantas mutantes AVP1OX.....	46
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Classificação atual dos FMAs mostrando as características que definem as famílias e gêneros de Glomales. Elaborada e atualizada conforme informações do INVAM. Fonte: ( <a href="http://invam.caf.wvu.edu">http://invam.caf.wvu.edu</a> ).....	15
<b>Figura 2.</b>	Esquemática de associação de fungos micorrízicos a raízes. (A) Fungo ectomicorrízico, evidenciando a formação da rede de Hartig e o manto fúngico. (B) Fungo micorrízico arbuscular, evidenciando os arbúsculos na célula e as vesículas.....	16
<b>Figura 3.</b>	Vasos multiplicadores contendo <i>Brachiaria brizantha</i> para produção dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> , <i>Scutellospora heterogama</i> , <i>Gigaspora decipiens</i> , <i>Gigaspora margarita</i> , <i>Glomus clarum</i> e <i>Gigaspora rósea</i> .....	23
<b>Figura 4.</b>	(A) Vasos contendo substrato areia-vermiculita-turfa (10:10:1 respectivamente) e o plantio da semente de tomateiro na camada superior. (B) Plântulas de tomateiro.....	24
<b>Figura 5.</b>	A altura média das plantas de tomateiro mutantes (AVP1OX) e tipo silvestre (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) ou não (AVP1OX; Wt) com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> (Gi) aos 7 diferentes épocas de análise, nas condições de limitação de nutrientes.....	28
<b>Figura 6.</b>	Percentual de estimulação ou inibição na altura das plantas de tomateiro mutantes (AVP1OX) e tipo silvestre (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) ou não (AVP1OX; Wt) com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> (Gi) nas 7 diferentes épocas de análise em condições de limitação de nutrientes.....	29
<b>Figura 7.</b>	Porcentagem de colonização micorrízica das plantas de tomateiro mutantes (AVP1OX) e tipo silvestre (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) ou não (AVP1OX; Wt) com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> (Gi) nas 5 diferentes épocas de análise, em condições de limitação de nutrientes.....	30
<b>Figura 8.</b>	Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro mutante super-expressando a proto-PPase vacuolar colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> , evidenciando: arbúsculo abortado (A) e (F), hifas de calibre grosso (B), arbúsculos (C) e (D), esporos (E) e hifas ao redor da raiz (G).....	31
<b>Figura 9.</b>	Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro mutante super-expressando a proto-PPase vacuolar colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> , evidenciando arbúsculos (C), arbúsculos em formação (D) e vesículas (A) e (B)..	32
<b>Figura 10.</b>	Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro tipo silvestre colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> , evidenciando: hifas ao redor da raiz (A), arbúsculos (B) e (C) e vesículas e esporos (D).....	33

<b>Figura 11.</b>	Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro tipo silvestre colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> , evidenciando raízes com arbúsculos, vesículas, hifas e esporos (A), (B), (C) e (D), vesícula isolada (G), vesículas (E) e arbúsculo isolado (F).....	34
<b>Figura 12.</b>	Acúmulo de macronutrientes sob condições de stress nas plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular <i>Glomus intraradices</i> (Gi) Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	35
<b>Figura 13.</b>	Porcentagem de colonização micorrízica de plantas de tomateiro mutantes AVP1OX e tipo silvestre (Wt), inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> (Gi) ou <i>Scutellospora heterogama</i> (Sh), ou com a dupla inoculação de <i>Glomus intraradices</i> + <i>Scutellospora heterogama</i> (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	36
<b>Figura 14.</b>	Análise temporal do crescimento das plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> (Gi) ou <i>Scutellospora heterogama</i> (Sh), ou com a dupla inoculação de <i>Glomus intraradices</i> + <i>Scutellospora heterogama</i> (Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	37
<b>Figura 15.</b>	Análise da Produtividade das plantas de tomateiro AVP1OX e tipo selvagem (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> (Gi) ou <i>Scutellospora heterogama</i> (Sh), ou com a dupla inoculação de <i>Glomus intraradices</i> + <i>Scutellospora heterogama</i> (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	39
<b>Figura 16.</b>	Atividade da Catalase de plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> (Gi) ou <i>Scutellospora heterogama</i> (Sh), ou com a dupla inoculação de <i>Glomus intraradices</i> + <i>Scutellospora heterogama</i> (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	43
<b>Figura 17.</b>	Atividade da Fosfatase Alcalina em plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares <i>Glomus intraradices</i> (Gi) ou <i>Scutellospora heterogama</i> (Sh), ou com a dupla inoculação de <i>Glomus intraradices</i> + <i>Scutellospora heterogama</i> (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	44



- Figura 18.** Atividade da Fosfatase Ácida em plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 44
- Figura 19.** População total de fungos e bactérias na rizosfera de plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 47

## RESUMO

DELL SANTO, Vanessa B.R. Centro Universitário de Vila Velha, Março de 2011. Respostas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) com superexpressão da H<sup>+</sup>-Pirofosfatase à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. Orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

Neste estudo avaliou-se aspectos da dinâmica populacional microbiana da rizosfera de plantas de tomateiro mutante (*Solanum lycopersicum L.*) com superexpressão da proto-pirofosfatase (AVP1OX) inoculadas individualmente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* Schenck & Smith, *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders, ou da dupla inoculação. Os resultados mostraram que o mutante superexpressor da proto-pirofosfatase (proto-PPase) responde diferencialmente aos tratamentos microbiológicos. O AVP1OX apresentou o mesmo perfil de colonização quando inoculado com *Scutellospora heterogama* ou *Glomus intraradices*, evidenciado um possível controle sobre a colonização do fungo micorrízico o maior crescimento foi observado no AVP1OX independente da inoculação individual, porém a dupla inoculação induziu uma significativa inibição no seu crescimento. A população de fungos na rizosfera foi estimulada nos tratamentos AVP1OX com inoculação individual, por outro lado os mutantes inoculados tiveram uma significativa redução na população de bactérias. Todos os tratamentos submetidos à inoculação, avaliados no presente estudo, induziram alterações na atividade de enzimas de estresse oxidativo (catalase e fosfatase ácida) sugerindo que alterações na fisiologia da planta são devido ao fungo micorrízico arbuscular. Essas alterações fisiológicas podem estar relacionadas com mudanças no padrão de exsudação radicular e por conseqüência induzindo alterações na microbiota do solo. Com isso especular que a especificidade na interação entre mutantes comerciais e fungos micorrízicos arbusculares é fundamental no desempenho da interação simbiótica.

Palavra-chave: fungos micorrízicos arbusculares, mutantes AVP1OX, tomateiro *Solanum lycopersicum L.*, nutrição, microbiota.

## ABSTRACT

DELL SANTO, Vanessa B.R. Centro Universitário de Vila Velha, Março de 2011. Responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with overexpression of the H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Advisor: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos.

This study evaluated the effect on population dynamics of microbial rhizosphere of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with overexpression of protons pyrophosphatase (AVP1OX) individually inoculated with mycorrhizal fungi *Glomus intraradices* Schenck & Smith, *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders, or dual inoculation. The results show that the mutant overexpressing the H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) responds differentially to microbial treatments. The AVP1OX showed the same profile of colonization when inoculated with *Glomus intraradices* and *Scutellospora heterogama*, providing possible control of mycorrhizal fungi colonization. The major growth observed on AVP1OX is independent of individual inoculation, but the dual inoculation induced a significant inhibition in their growth. The population of fungi in the rhizosphere was stimulated in treatments inoculated AVP1OX individual; however, inoculated mutants have a significant reduction in bacteria population. In all inoculated treatments evaluated in this study, induced changes in enzyme activities of oxidative stress (catalase and acid phosphatase), suggesting that changes in plant physiology are due to AM fungi. These physiological changes may be related to changes in the pattern of root exudation and thus inducing changes in soil microbes. Thus, we speculate that the specificity in the interaction between mutants and commercial mycorrhizal fungi is crucial in the performance of symbiotic interaction.

Keyword: arbuscular mycorrhizal fungi, mutants AVP1OX, tomato *Solanum lycopersicum* L., nutrition, microbiology.

# 1. INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado, o processo de degradação ambiental vem aumentando com uso de adubos, pesticidas, desenvolvimento industrial e desmatamentos resultando em perdas irreversíveis e induzindo importantes degradações ambientais. Historicamente, quanto maior o progresso técnico humano e quanto mais rápido o crescimento econômico, maior tem sido o ritmo de alterações provocadas no meio ambiente. Diante deste cenário ocorre uma necessidade sustentável de pesquisas em recuperação de áreas degradadas e melhor manejo em áreas produtivas.

No século 21, as alterações climáticas particularmente nas regiões tropicais e subtropicais são previstas por resultarem drásticas secas e inundações, comprometendo o fornecimento mundial de alimentos (Battisti & Naylor, 2009). Nesse contexto, alternativas para aumentar a produtividade e qualidade das colheitas no campo, bem como, a limitação global de recursos naturais como os fertilizantes são o foco da atualidade na busca da sustentabilidade (Cordell et al., 2009).

Dentre as diversas relações ecológicas existentes entre plantas e microrganismos, destaca-se a simbiose micorrízica (Harley & Smith, 1983; Botha et al., 2011) que é a união orgânica entre raízes das plantas e fungos do solo, com dependência fisiológica íntima e recíproca, seguida pelo crescimento dos simbiontes (Siqueira & Franco, 1988; Berbara et al., 2006). A micorriza arbuscular endotrófica (MA) é a mais comum, ocorrendo em mais de 80% das espécies de plantas (Schübler et al., 2001).

As micorrizas constituem parte da microbiota do solo degradados que influenciam no aumento da produtividade, facilitam a recuperação de solos degradados e biorremediam espaços contaminados, atuando na agregação do solo. Estas associações simbióticas, denominadas simplesmente de micorrizas, ocorrem de forma generalizada na natureza e estão amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes terrestres, e na grande maioria (90%) das espécies vegetais conhecidas (Trappe et al., 1982; Linderman, 1994; Fitter et al., 1996, Smith & Read, 2008). Existem evidências que os exudatos radiculares das plantas contêm moléculas sinalizadoras que estimulam a ramificação das hifas (Buée et al., 2000). Assim, o fungo micorrízico responde positivamente e acontece uma cascata de

sinais envolvendo a ativação de genes específicos do hospedeiro em função da simbiose (Chabaud et al., 2002; Kosuta et al., 2003).

Na associação entre FMAs e bactérias promotoras de crescimento (BPC), Mäder et al. (2011) evidenciaram um aumento de produção por hectare em valor nutricional por grão em cultivo de trigo; um equivalente em energia diária suficiente para suprir 25,5 pessoas (safra sem inóculo de FMA e BPC) para 36,1 pessoas/diariamente com colheitas inoculadas com FMAs e as BPCs. Isto equivale a suprir 1/3 de energias calóricas diárias requeridas; devido a um aumento de nutrientes nos grãos cultivados com inóculos associados. O aumento na produtividade foi evidenciado também em arroz entre 11 e 14%; com *G. intaradices* e com redução de 50% do P recomendado para aplicação, e um aumento de 23% quando inoculado (Jha et al., 2009)

Os transgênicos no mundo tem sido desenvolvidos e testados para aumentar a performance no campo (Badri et al., 2009), neste contexto, mutantes super-expressando a pirofosfatase representam uma promissora alternativa para resolver o problema de áreas com intensa variação climática.

As FMAs são incapazes de crescer na ausência de raízes vivas, e sua germinação começa por um esporo assexual no solo, independente da presença de hospedeiro, podendo ocorrer até na água. Entretanto o crescimento da hifa só ocorrerá após a percepção de sinais moleculares sintetizados pela planta, através de flavonóides estimuladores que não estão completamente elucidados na atualidade (Badri et al., 2009).

Acredita-se que os diferentes fotoassimilados que chegam às raízes podem atuar regulando a atividade de diversas enzimas, bem como a presença de açúcares e aminoácidos, o que pode favorecer determinadas espécies de fungos apresentarem maior crescimento que outras, o que responde a diferentes crescimentos em diversas associações de MAs e espécies de plantas (Berbara et al., 2006).

Nesse contexto, alguns autores têm mostrado que os benefícios da micorrização estão diretamente relacionados à maior eficiência das proteínas de membrana responsáveis pelos sistemas primários e secundários de transporte de prótons. Muitas classes de proteínas transportadoras desempenham um importante papel para que as plantas absorvam nutrientes do solo, pois elas aumentam a movimentação de solutos pela membrana da célula (Ramos et al., 2005).

Estudos de Park et al. (2005) com mutantes de *Arabidopsis thaliana* demonstraram que a super-expressão do gene AVP1OX, codificando uma H<sup>+</sup>-PPase vacuolar, resultou em positivos e significantes incrementos no desenvolvimento radicular, bem como uma maior absorção de nutrientes e transporte de auxina.

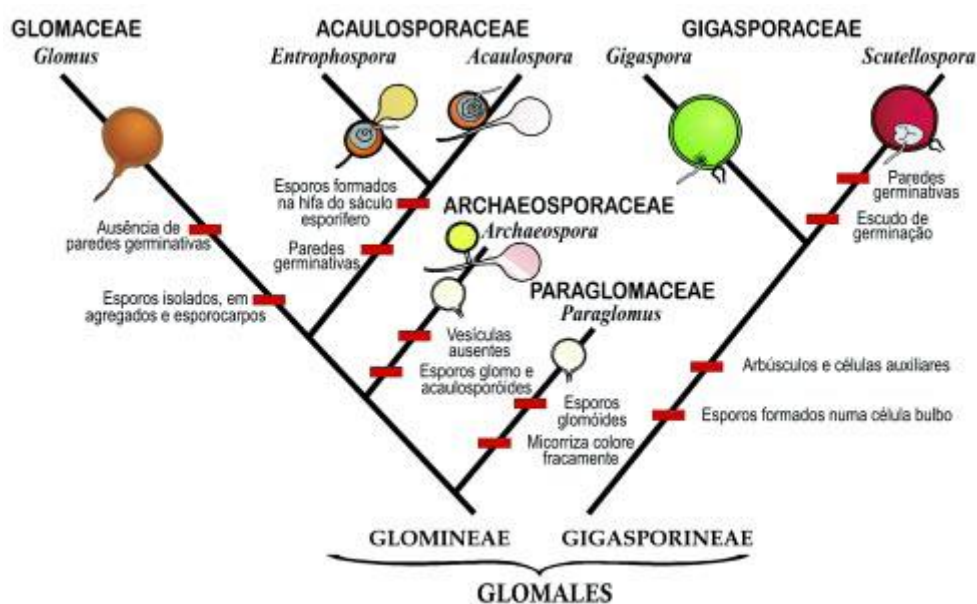
Deste modo, pode ser feito uma analogia entre micorrização e da superexpressão do gene AVP1OX codificando a H<sup>+</sup>-PPase baseando-se nos seus benefícios às plantas que são importantes a agricultura em solos pobres em nutrientes; estudos são necessários de forma a entender os efeitos da interação entre micorrizas arbusculares e mutantes superexpressando a H<sup>+</sup>-PPase nas respostas adaptativas das plantas aos estresses bióticos e abióticos.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Importância da simbiose micorrízica

Com o advento da genética e o desenvolvimento de mutantes tornou-se possível aumentar a dinâmica das pesquisas fornecendo promissora ferramenta que se converte em conhecimento mais elaborado dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos das plantas e suas simbioses, permitindo um discernimento para o manejo de biotecnologias (Gaxiola et al., 1999; 2002; 2005; 2007).

Os fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota) possuem micélio cenocítico, sem septos, cujo principal componente estrutural da parede celular é a quitina, pertencem à ordem Glomales (Zygomycetos), na qual são consideradas duas subordens, Glominea com quatro famílias: Acaulosporaceae (*Acaulospora* e *Entrophospora*), Archaeosporaceae (*Archaeospora*), Paraglomaceae (*Paraglomus*) e Glomaceae (*Glomus*) e a subordem Gigasporineae com a família: Gigasporaceae (*Gigaspora* e *Scutellospora*). A classificação baseia-se em características morfológicas das paredes dos esporos produzidos por estes fungos, permitindo descrever o que se denomina morfoespécies fúngicas. Recentemente dados moleculares, como padrão de ácidos graxos e análise filogenética baseada na unidade (18S) do DNA têm sido incorporados na classificação (Souza, 2000).



**Figura 1.** Classificação atual dos FMAs mostrando as características que definem as famílias e gêneros de Glomales. Elaborada e atualizada conforme informações do INVAM. Fonte: (<http://invam.caf.wvu.edu>).

Espécies de Brassicaceas, Caryophyllaceas, Chenopodiaceas e Urticaceas, resistem a colonização micorrizica (Vieheilig et al., 1994), esta ligação pode estar em sua deriva ou especialização observado pelo habitat (Fitter & Moyersoen, 1996). O surgimento das hifas a partir de apressórios é a primeira indicação de compatibilidade entre os simbiontes, que depende dos genomas do fungo micorrízico e da planta hospedeira (Lambais, 1996).

Estas simbioses são especialmente adaptadas a ambientes ricos em matéria orgânica que não existiam na terra antes do desenvolvimento das MAs. Interessante observar que forças seletivas conduziram a coexistência do mutualismo pelas duas partes, fungo e planta hospedeira. Algumas plantas existem sem o fungo, porém sofrendo a falta de nutrientes e água em solos pobres, os fungos que precisam das plantas por um ciclo de vida obrigatório.

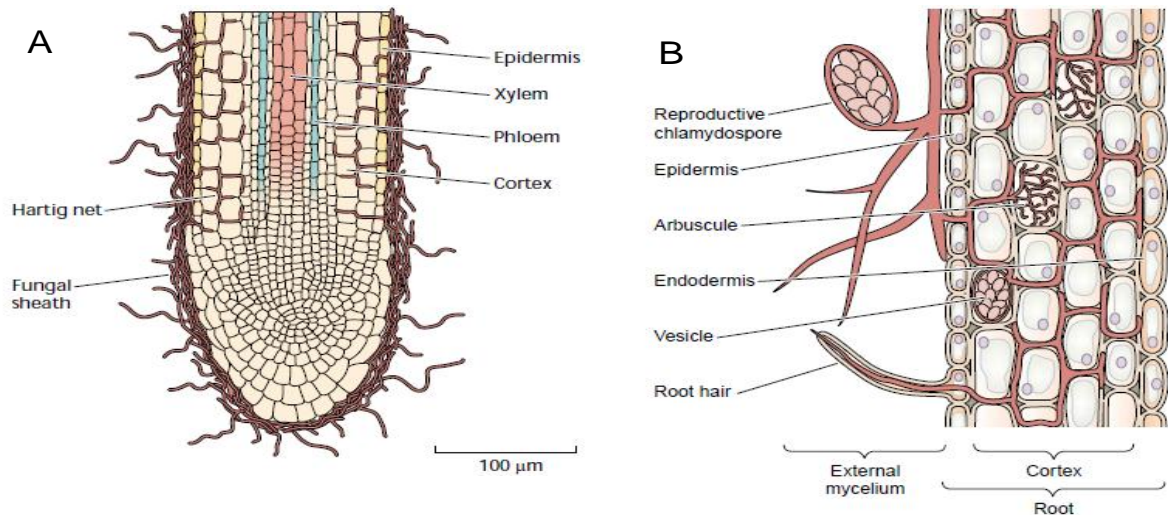


Figura 2. Esquemática de associação de fungos micorrízicos a raízes. (A) Fungo ectomicorrízico, evidenciando a formação da rede de Hartig e o manto fúngico. (B) Fungo micorrízico arbuscular, evidenciando os arbúsculos na célula e as vesículas.



## 2.2. Exudação radicular em plantas micorrizadas

A presença de FMAs em associações as raízes da planta afeta quantitativamente e qualitativamente os exsudatos radiculares, o que conseqüentemente altera a microbiota associada à micorrizosfera, de forma diferente daquela onde só as raízes estão presentes (Lindermann, 1988).

A formação de micorrizas altera o padrão de exsudação radicular (Graham et al., 1981), bem como a prioridade de ocorrência de outros fungos/bactérias. As alterações ambientais favorecem a ocupação de determinadas espécies de fungos. Exsudatos de raiz de plantas fosfato-deficientes são mais ativas em crescimento de hifas e alongação do esporo de *Glomus fasciculatus* que exsudatos de plantas sensíveis a fosfato (Elias & Safir, 1987).

É sugerido um “efeito micosférico” para descrever o aumento de comunidades microbianas de certos microrganismos próximos às estruturas fúngicas do solo. Tem-se observado que enquanto alguns grupos de microrganismos são favorecidos pelos exsudatos dos fungos, outros são inibidos (Linderman, 1988).

Os exsudatos liberados pelas plantas quando estimuladas pela FMAs aumentam a imobilização de metais, cuja presença altera os níveis hormonais e as reações de defesa. Sabe-se que flavonóides são promotores de germinação de esporos de MAs fungos em raízes de plantas (Gianinazzi-Pearson et al., 1989).

O evento inicial da interação planta-microrganismo, pelo menos nos ambientes saturados com água, envolve a quimiotaxia por exsudatos de raízes. Substâncias tais como açúcares, aminoácidos, vários ácidos dicarboxílicos como succinato, malato, fumarato, e compostos aromáticos incluindo shiquimato, quinato, vanilato, catecol, luteolin entre outros atraem microrganismos diversos (Robinson & Bauer, 1993). No caso de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) sabe-se que o CO<sub>2</sub> e fatores radiculares ainda não caracterizados são necessários para a quimiotaxia (Becard et al., 2004).

Nos exsudatos radiculares foram detectados a presença de BF (*branching factors*) por Nagahashi & Douds, (1999) e Tawaraya et al. (1998). Ensaios posteriores evidenciaram que os BFs só estão presentes em exsudatos de raízes de plantas com micorrizas (hospedeiras) por Nagahashi & Douds (1999) confirmado por Buée et al. (2000), observações posteriores concluíram que esses fatores estavam presentes em condições de baixo P (fósforo) (Nair et al., 1991). Nagahashi & Douds (1999) concluíram que o BF é lipofílico, entretando sua baixa concentração e relativa

instabilidade no exsudato de raiz de *L. japonicus* dificultou sua purificação, mais tarde Akiyama et al. (2006).

Estudos em ecologia microbiana é uma ferramenta importante na avaliação da transdução de sinais. A microbiota pode variar pela espécie de planta (Innes et al., 2004; Batten et al., 2006); pelos ecotipos ou quimiotipos entre espécies (Kowalchuk et al., 2006; Micallef et al., 2009), em diferentes estágios do desenvolvimento da planta (Mougel et al., 2006; Weisskopf et al., 2006) e diferentes tipos de raízes ocasionam microorganismos específicos (Yang & Crowley, 2000; Baudoin et al., 2002).

O estudo com mutantes demonstrou que o gene mutante para uma dada função da planta influencia a comunidade microbiana demonstrando não só a importância destes genes para a fisiologia da planta, mas também seus efeitos em interações com os microorganismos (Badri et al., 2009). As biotecnologias que incorporam FMAs e PGPR (bactérias promotoras de crescimento) sozinhas ou associadas têm sido amplamente pesquisadas com objetivo de aumentar a produtividade evitando o uso de fertilizantes (Antursson et al., 2006; Smith & Read, 2008; Mäder et al., 2011).

Nos ecossistemas naturais uma grande variedade de microorganismos coexistem nas raízes das plantas. Nos solos erodidos o FMA ocasiona efeitos não só na composição química dos solos, mas também nas propriedades físicas e microbianas (Porazinska et al., 2003; Barea et al., 2004; Giri et al., 2005).

Os fungos constituem a base de um importante canal de energia no trabalho de nutrição do solo, abastecendo populações de microartrópodes e outras mesofaunas (Hunt et al., 1987); as MAs contribuem para esse fluxo mesmo quanto em pequena quantidade, são de qualidade quando comparados ao fungos saprófitas (Klironomos & Kendrick, 1996); esses microartrópodes tem importante papel no processamento da matéria orgânica por mecanismos físicos, químicos e biológicos (Wolters, 2000); mas estes dados não qualificam as micorrizas como interações com estas microfaunas, mas sim como liderança de modificações nas comunidades fúngicas determinando alterações nos processos de agregação do solo como na secreção de compostos (glomalina) favorecendo efeitos de aumento na população de artrópodes e na abundância da composição na comunidade (por qualidade dos efeitos alimentares) e alterações na arquitetura do micélio ocasionando respostas instigantes e ainda pouco exploradas (Tansley, 2006).

### 2.3. Perspectiva ecofisiológica da inoculação de mutantes com superexpressão da H<sup>+</sup>-PPase

Park et al. (2005), realizaram estudos sobre a superexpressão da H<sup>+</sup>-PPase vacuolar AVP1OX em um cultivo de tomate, visando a agricultura. Estudos bioquímicos e de transporte confirmaram a expressão funcional da proteína recombinante na linhagem dos tomates mutantes. Determinações da atividade hidrolítica da H<sup>+</sup>-PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens representativas AVP1OX e plantas controles, mostraram que os mutantes tiveram em média 56% de aumento de sua atividade em relação às plantas controles, enquanto a ATPase do tipo V, não sofreu modificações significativas. Em seguida, as plantas foram submetidas a estresse hídrico, durante um período de 13 dias, resultando em afetação de ambas as plantas (transgênica e controle). Entretanto, as plantas mutantes demonstraram recuperação após o alívio do stress do déficit de água. Uma consistente explicação para tal resposta, está baseada no aumento do peso seco da raiz e maior acumulação de P<sub>i</sub> na parte aérea das plantas mutantes AVP1OX.

Estudos realizados em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), realizado por Gaxiola et al. (1999), mostraram a existência de várias proteínas associadas à tolerância e desintoxicação de sal: canais de clorídeo, bombas de H<sup>+</sup> e antiporteres Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Sendo assim, pode ser sugerido, analogicamente, que o mecanismo de desintoxicação em leveduras e em plantas é similar. Ramos et al. (2005), realizaram estudos associando a atividade ATPásica e Pirofosfatásica com inoculação de fungos micorrízicos (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) em raízes de milho. Observaram que as raízes de milho, potencialmente colonizadas, tiveram atividade ATPásica e pirofosfatásica estatisticamente superior ao do tratamento não inoculado. Sendo assim, pode ser feita analogia entre micorrização e plantas mutantes AVP1OX (H<sup>+</sup>-PPase superexpressada), pois ambas causam efeitos semelhantes nos indivíduos. Dados moleculares relataram anteriormente a mesma capacidade do fungo micorrízico arbuscular de induzir a expressão de gene H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática na planta hospedeira tal como nos mutantes AVP1OX (Murphy et al., 1996; Gianinazzi-Pearson et al., 2000; Ferrol et al., 2002; Krajinski et al., 2002).

Se torna claro, que a H<sup>+</sup>-PPase do vacúolo de plantas é a enzima mais atrativa, especialmente, em relação a estrutura-função como um modelo de bomba

de prótons, a sua evolução molecular como um marcador enzimático de vacúolo de plantas, e a sua relação fisiológica do vacúolo de plantas.

Toda ativação ou alteração no crescimento microbiano é relacionado à exsudação radicular. Assim, diversos estudos têm dedicado a comparar os efeitos de plantas plantas transgênicas na exsudação e alteração dinâmica populacional de microrganismos do solo. Rillig et al. (2004) observaram uma tendência entre os perfis de comunidade bacteriana total e grupos específicos, como alfa e beta, de Proteobacteria, Actinomicetos e Pseudomonas, comprovando que essas plantas podem modificar a estrutura da microbiota, embora nenhum estudo tenha avaliado os seus efeitos nos FMAs.

Segundo Bruinsma et al. (2003), diversos estudos que avaliam o efeito de plantas geneticamente modificadas sobre microrganismos do solo, com técnicas distintas detectaram variações ou tendências diferentes em extensão e intensidade sem, entretanto, serem capazes de demonstrar efeito significativo dos transgenes. 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 Schmalenberger & Tebbe, (2002) e Milling et al. (2004).

Destacamos que são necessários mais estudos relacionados a  $H^+$ -PPase e a regulação das bombas, de modo geral, para que se conheçam todos os benefícios de aplicações de plantas de tomate AVP1OX no ambiente.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

A inoculação de mutantes AVP1OX com fungos micorrízicos arbusculares é uma alternativa para maximizar o crescimento das plantas.

### 3.2. Objetivos específicos

1. A inoculação de mutantes AVP1OX é uma alternativa para maximizar o crescimento das plantas sob condições de limitação de fósforo?
2. A produtividade de plantas de tomate seria aumentada com a inoculação com FMAs?
3. Como se comporta a atividade de enzimas de estresse oxidativo, a microbiota e macronutrientes com e sem nutrição em plantas mutantes e controles inoculadas com FMAs?

- Análise do crescimento e acumulação de macronutrientes na parte aérea de plantas de tomate mutantes AVP1OX e tipo selvagem, inoculadas ou não com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* Schenck & Smith (Gi) ou *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders (Sh), ou com a dupla inoculação (+Gi+Sh);

- Análise características do crescimento, produtividade e de enzimas de estresse oxidativo (catalase e fosfatases) das plantas de tomate mutantes AVP1OX e tipo selvagem, inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* Schenck & Smith ou *Scutellospora heterogama* Walker & Sanders, ou com a dupla inoculação;

- Através da microscopia óptica, quantificar e observar a colonização micorrízica radicular, evidenciando as alterações celulares e estruturais nas raízes das plantas de tomate mutantes AVP1OX e tipo selvagem, inoculadas ou não, com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* Schenck & Smith ou *Scutellospora*

*heterogama* Walker & Sanders, ou com o uso combinados dos dois fungos micorrízicos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material biológico: inóculo dos fungos micorrízico arbusculares

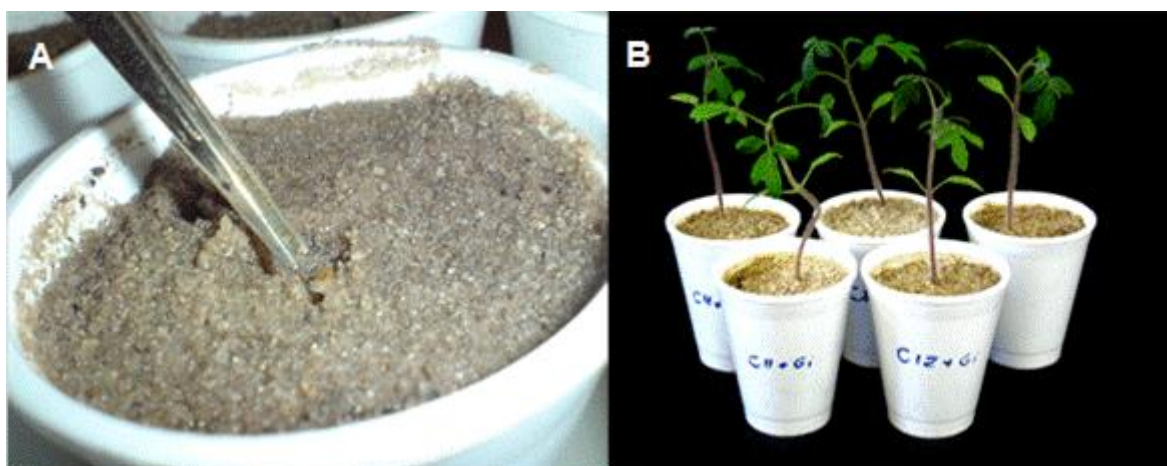
Os esporos de *Glomus intraradices* foram obtidos do Bank Exchange of Glomales (BEG, Dijon - França) e Gigasporaceae da ESALQ; ambos *Glomus intraradices* e *Scutellospora heterogama* foram utilizados de vasos multiplicadores do próprio LMAB-UVV. Os inóculos individuais foram multiplicados e mantidos em vasos na casa-de-vegetação. O substrato adotado para multiplicação foi uma mistura de areia e solo latossolo vermelho-amarelo com baixo teor de Pi. A areia foi lavada em água corrente durante 24h e o pH ajustado para 5,6. O solo foi peneirado em peneira de de malha 1x1cm para remoção de materiais consolidados de grande fração granulométrica. A mistura foi feita na proporção 3:1 (Areia: Latossolo) e em seguida autoclavada 2 vezes a 121°C por 2h, em um intervalo de 24h, para posterior preparo dos vasos. O substrato foi distribuído em vasos de 5 litros, 100g de inóculo composto de raízes colonizadas, esporos e hifas fúngicas, ficaram dispostos na região mais superficial do vaso (cerca de 3 cm de profundidade), e coberto com uma fina camada de substrato, facilitando assim o contato inicial da raiz com o inóculo. Sementes de *Brachiaria brizantha* foram semeadas e após 6 meses de cultivo, suas raízes foram utilizadas como inóculo.



Figura 3. Vasos multiplicadores contendo *Brachiaria brizantha* para produção dos inóculos de fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* e *Scutellospora heterogama*.

## 4.2. Obtenção, esterilização e taxa de germinação das sementes

As sementes dos mutantes AVP1OX de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) foram gentilmente cedidas pelo laboratório do prof. Dr. Roberto Gaxiola (Universidade do Arizona). As sementes foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos, lavadas em água destilada, e transferidas para placas de petri contendo solução de germinação de ácido bórico (0.1mM), glicose (2 g/L), sulfato de cálcio (500  $\mu$ M) e ágar (10%), a pH 5,7. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento e posteriormente, foram transferidas para os vasos contendo os inóculos. O plantio foi realizado em substrato de areia:vermiculita:turfa (10:10:1) previamente autoclavado, e distribuídos em vasos de 250ml para que favorecesse o contato imediato da radícula das plântulas de tomate com o fungo (Figura 4). Durante o desenvolvimento das plantas foram feitas a aplicação de solução nutritiva de Clark modificada (1/4 F) (duas vezes por semana).



**Figura 4.** (A) Vasos contendo substrato areia-vermiculita-turfa (10:10:1 respectivamente) e o plantio da semente de tomate na camada superior. (B) Plântulas de tomate. Foto: Arthur Siqueira, 2010.

## 4.3. Parâmetros de crescimento

Para a avaliação do crescimento as plantas, foram coletadas aleatoriamente (cinco plantas por tratamento) aos 140 dias após a germinação, avaliando-se a altura e produtividade.



#### **4.4. Determinação da taxa de colonização micorrízica**

A avaliação da colonização micorrízica foi realizada conforme KOSKE & GEMMA (1989) e GRACE STRIBEY (1991). A porcentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada como descrito por GIOVANETTI & MOSSE (1980), adaptado a partir do método de medidas de comprimento de raízes. Foram avaliados o número de arbúsculos, vesículas, células auxiliares nas respectivas raízes, levando-se em consideração, os que possuem estas estruturas.

#### **4.5. Contagem da população microbiana**

A determinação da população de fungos e bactérias foi realizada utilizando-se a técnica “*Pour Plate*” de contagem em placas de Petri. Preparou-se uma diluição seroada decimal em série, adicionando-se 10g da amostra de solo (contendo raízes de tomate 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<sup>®</sup>, como contagem adicional.

## **4.6. Avaliação das enzimas oxidativas**

### **4.6.1. Catalase (CAT E.C. 1.11.1.6)**

A atividade da CAT foi analisada sob metodologia descoberta por Beutler (1975). Os tecidos foram homogeneizados em 50 mM tampão TRIS-HCL, pH 8,0, em relação 1:5 para N, e centrifugados a 15.000 x g durante 15 minutos à 4°C. Amostras foram incubadas em meio de reação contendo 50 mM tampão TRIS-HCL, pH 8,0/ 0,10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi iniciada pela adição do extrato e acompanhada a 240 nm, durante 30 segundos. Uma unidade de catalase foi definida com a quantidade de enzimas que catalisa a decomposição de 1 micromol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto/Mg de proteína a 25°C.

### **4.6.2. Fosfatase Ácida (ACP E.C. 3.1.3.2)**

A atividade da ACP foi determinada de acordo com Barred (1972), porém utilizando para-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato. Os tecidos foram homogeneizados em 20 mM tampão acetato de sódio, pH 5,0, numa relação 1:5 (p/v), e centrifugados a 15.000 g durante 15 minutos à 4°C. Amostras foram incubadas por 10 minutos em meio de reação contendo 20 mM tampão, acetato de sódio pH 5,0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM pNPP e o extrato enzimático. A reação foi interrompida pela adição de 1 mM NaOH. A atividade foi determinada baseada na formação de P,nitrofenol (pNPP), a 40 SnM. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 micromol de pNPP/Mg proteína/minuto, a 25°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).

### **4.6.3. Fosfatase Alcalina (ALP E.C. 3.13.1)**

Foi descrita de acordo com Barred (1972), porém utilizando pNPP como substrato. A atividade da ALP foi determinada em cubetas de 1 ml, contendo 20 mM de tampão bicarbonato de sódio, pH 9,2, 2 mM pNPP e 100 mM MgCl<sub>2</sub>; a reação foi iniciada pela adição de 1M NaOH, seguida por centrifugação à 3000 rpm por 3

minutos. A atividade foi determinada baseada na formação de pNPP a 405 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de transformar 1 micromol de substancia por minuto. A atividade foi expressa como micromol GSH min<sup>-1</sup> protein<sup>-1</sup>.

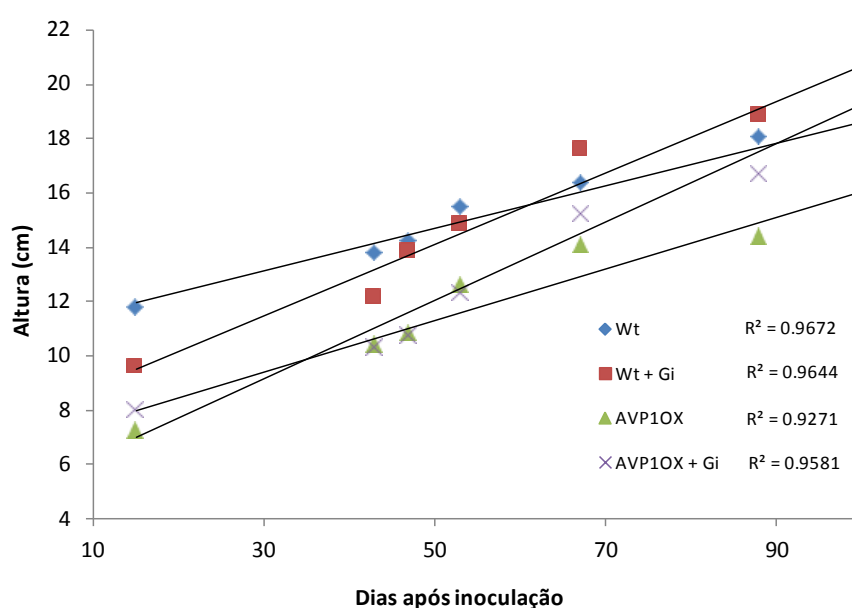
#### **4.7. Análise Estatística dos Dados**

Os experimentos foram realizados no delineamento experimental de blocos casualizados com 10 repetições, constando de 6 tratamentos (controle = Wt, Wt +Gi, Wt+Sh, Wt +Gi/Sh, AVP1OX+Gi, AVP1OX+Sh, AVP1OX+Gi/Sh). 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 – Sistema de Análise Estatística e Genética (Euclides, 1983).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito da inoculação de mutantes AVP1OX em condições de limitação nutricional

Durante o início do experimento, foi observado um maior crescimento dos tratamentos controles em relação aos tratamentos inoculados, todavia, após determinado 60 dias para Wt e 35 dias para AVP1OX, houve uma inversão deste cenário, onde as plantas micorrizadas cresceram mais do que o controle (Figura 5).

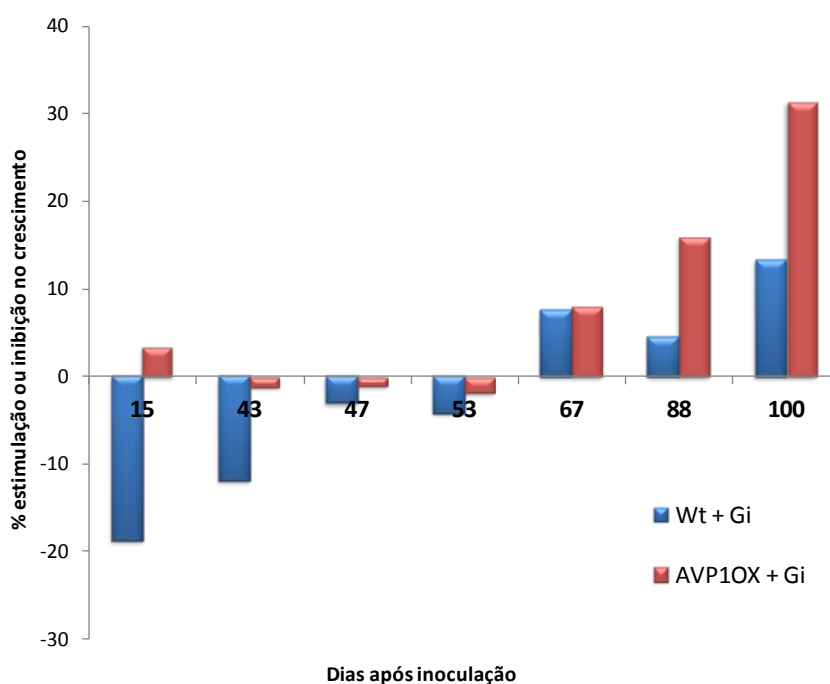


**Figura 5.** A altura média das plantas de tomate mutantes (AVP1OX) e tipo selvagem (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) ou não (AVP1OX; Wt) com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* (Gi) aos 7 diferentes épocas de análise, nas condições de limitação de nutrientes.

Especula-se que as plantas mutantes tenham sido menos afetadas pelo estresse nutricional, pois a superexpressão da  $H^+$ -PPase, poderia conferir uma maior transferência de carbono na interface planta/fungo. Estes fatores podem explicar a inversão do padrão de crescimento ocorrido entre os tratamentos.

Com os resultados de alto teor de P na parte aérea de plantas de AVP sob stress, vem a confirmar a baixa colonização com estudos de Smith & Read. (2008) ao verificar que quanto maior a deficiência de fósforo na planta, maior é a probabilidade do fungo se associar às raízes; explicando assim a menor colonização se manifestar no AVP1 com *Glomus intraradices*.

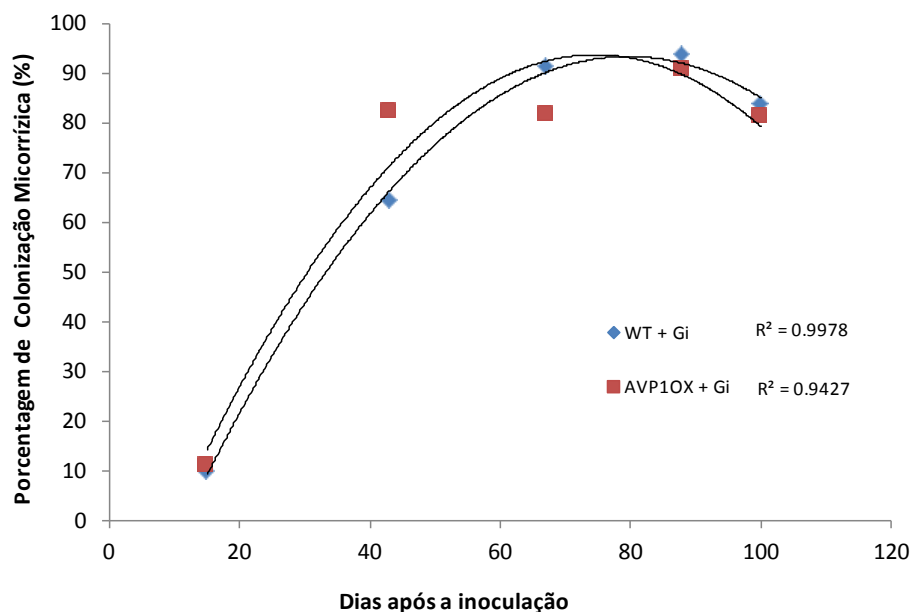
O fungo micorrízico utilizado nesse experimento, *Glomus intraradices*, demanda uma grande quantidade de carbono nas raízes, e poderia funcionar como um forte dreno. Este fator causou uma inibição do crescimento de ambos os tratamentos, no período inicial (Figura 6). Esta inibição foi mais evidente no tratamento Wt+Gi, ao passo que as plantas do tratamento AVP1OX+Gi foram menos afetadas.



**Figura 6.** Percentual de estimulação ou inibição na altura das plantas de tomateiro mutantes (AVP1OX) e tipo silvestre (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) ou não (AVP1OX; Wt) com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* (Gi) nas 7 diferentes épocas de análise em condições de limitação de nutrientes.

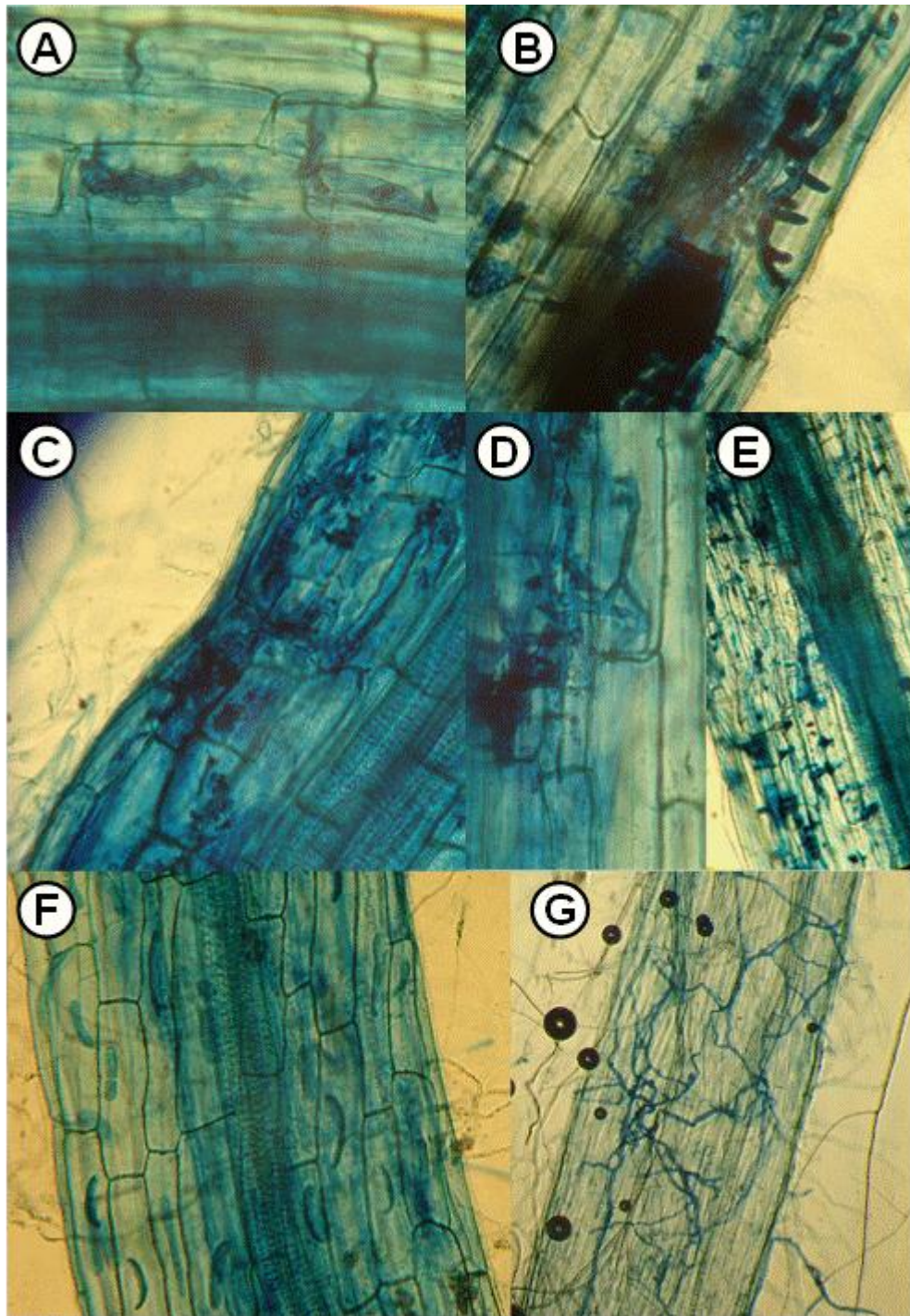
## 5.2. Colonização micorrízica

Observou-se um padrão de colonização semelhante para ambos os tratamentos. Cerca de 70 dias após a inoculação do FMA ocorreu uma estabilização deste percentual em torno de 80% (Figura 7). Este comportamento era esperado para a maioria das colonizações e não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que não há bloqueios das plantas mutantes ao fungo durante o processo de formação simbiótica.

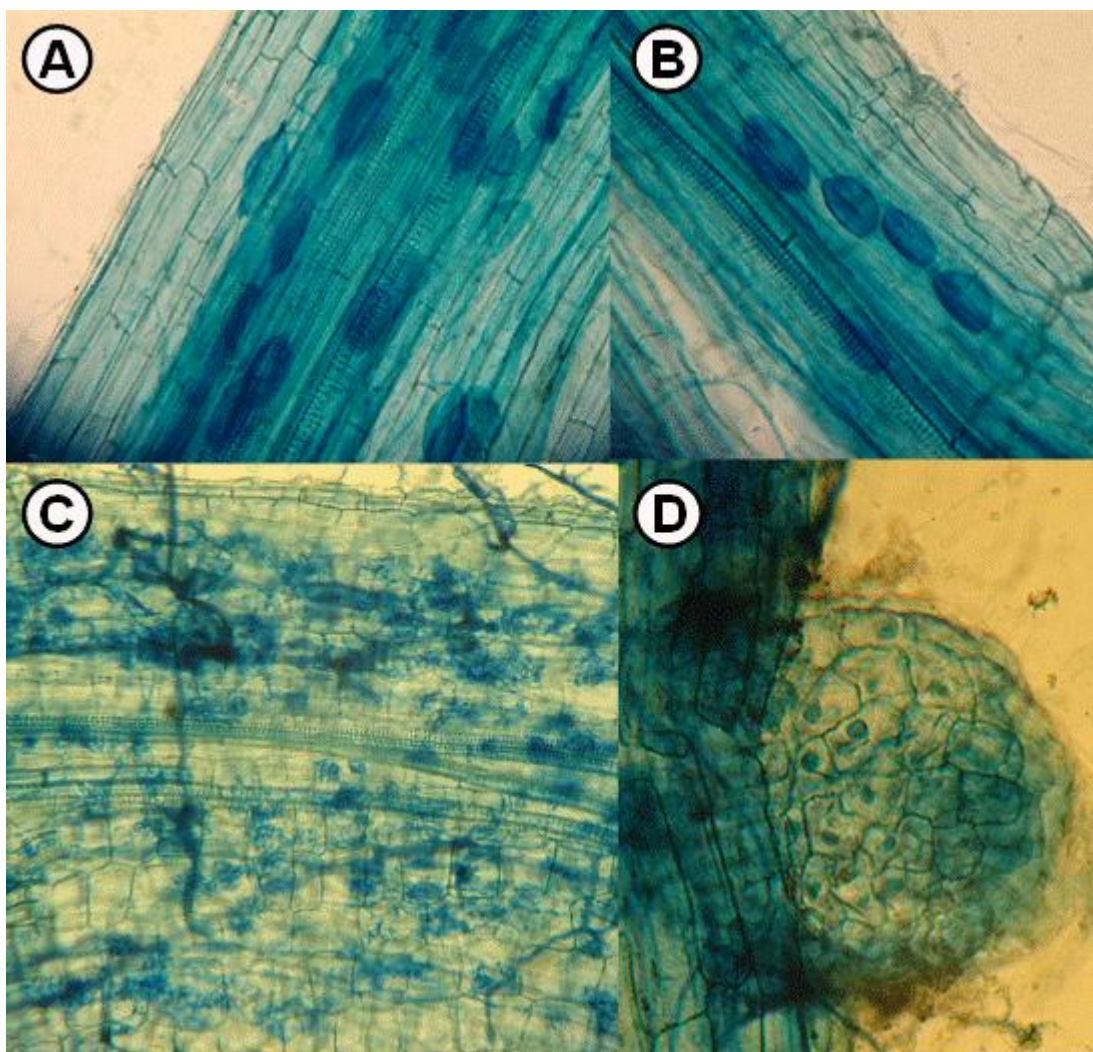


**Figura 7.** Porcentagem de colonização micorrízica das plantas de tomateiro mutantes (AVP1OX) e tipo silvestre (Wt), inoculadas (AVP1OX+Gi; Wt+Gi) com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* (Gi) nas 5 diferentes épocas de análise, em condições de limitação de nutrientes.

A colonização micorrízica nas raízes de tomateiros mutantes (AVP1OX), mostrou um grande número de vesículas (Figura 9A, Figura 9B), seguido por focos de arbúsculos em determinadas porções da raiz (Figura 9C, Figura 8C, Figura 8D) e inúmeras hifas (Figura 8G) e esporos (Figura 8E). Nas raízes laterais em desenvolvimento, foi possível observar arbúsculos em formação (Figura 9D) o que demonstra que a colonização ocorre em períodos iniciais de formação do córtex radicular. Contudo comportamentos não usuais, também foram observados nestas raízes, como o engrossamento das hifas do fungo simbiote (Figura 8B) e arbúsculos abortados (Figura 8A, Figura 8F). Isso sugere que haja mecanismos de defesa nas raízes destas plantas mutantes que dificultam o processo de associação, tais mecanismos podem ser de natureza bioquímica, como, por exemplo, a produção de exsudatos pela raiz, ou de natureza física, como, por exemplo, o fortalecimento da parede celular devido a uma maior produção de microfibrilas, ou o desbalanço de citocininas segundo Slezack et al. (2000).



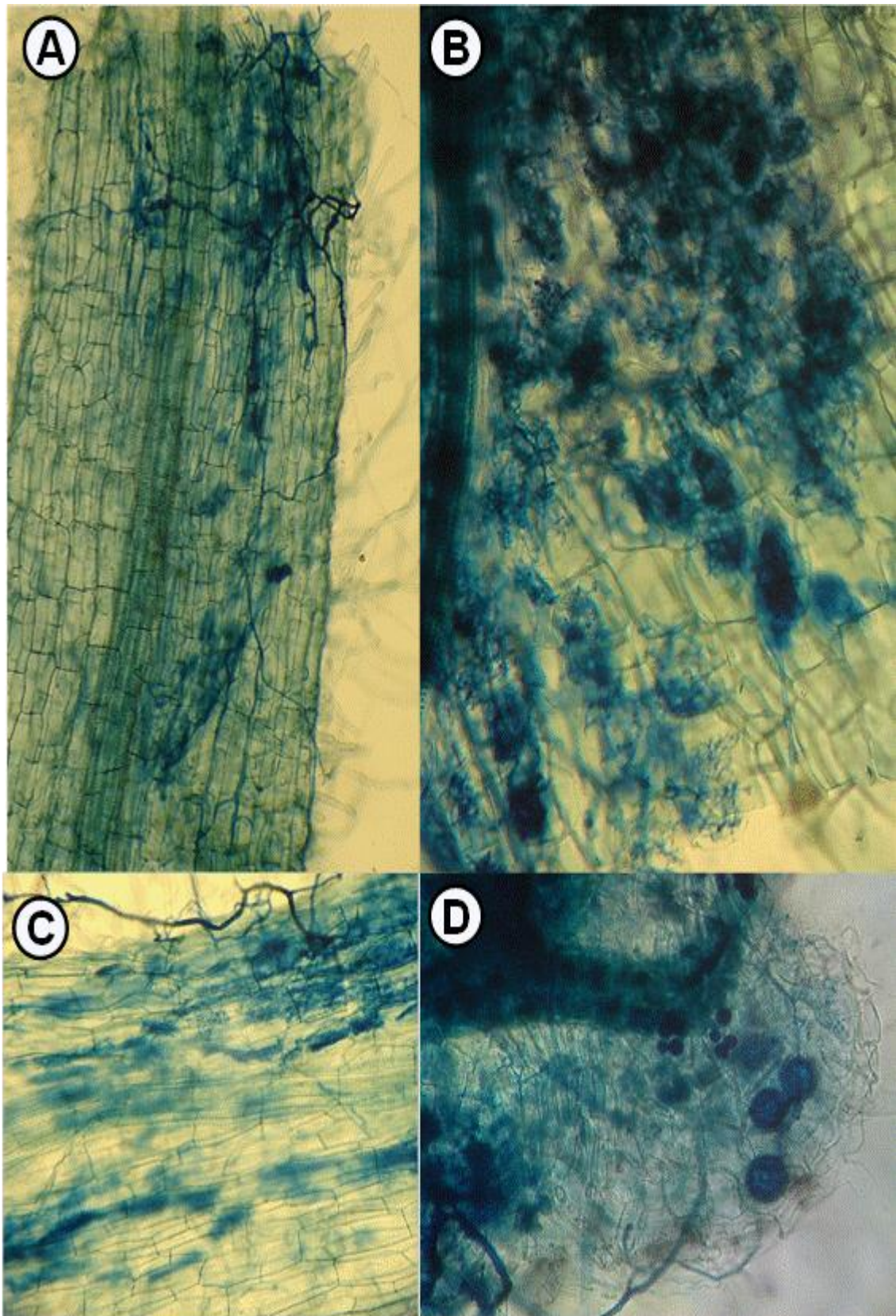
**Figura 8.** Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro mutante super-expressando a  $H^+$ -PPase colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, evidenciando: arbúsculo abortado (A) e (F), hifas de calibre grosso (B), arbúsculos (C) e (D), esporos (E) e hifas ao redor da raiz (G).



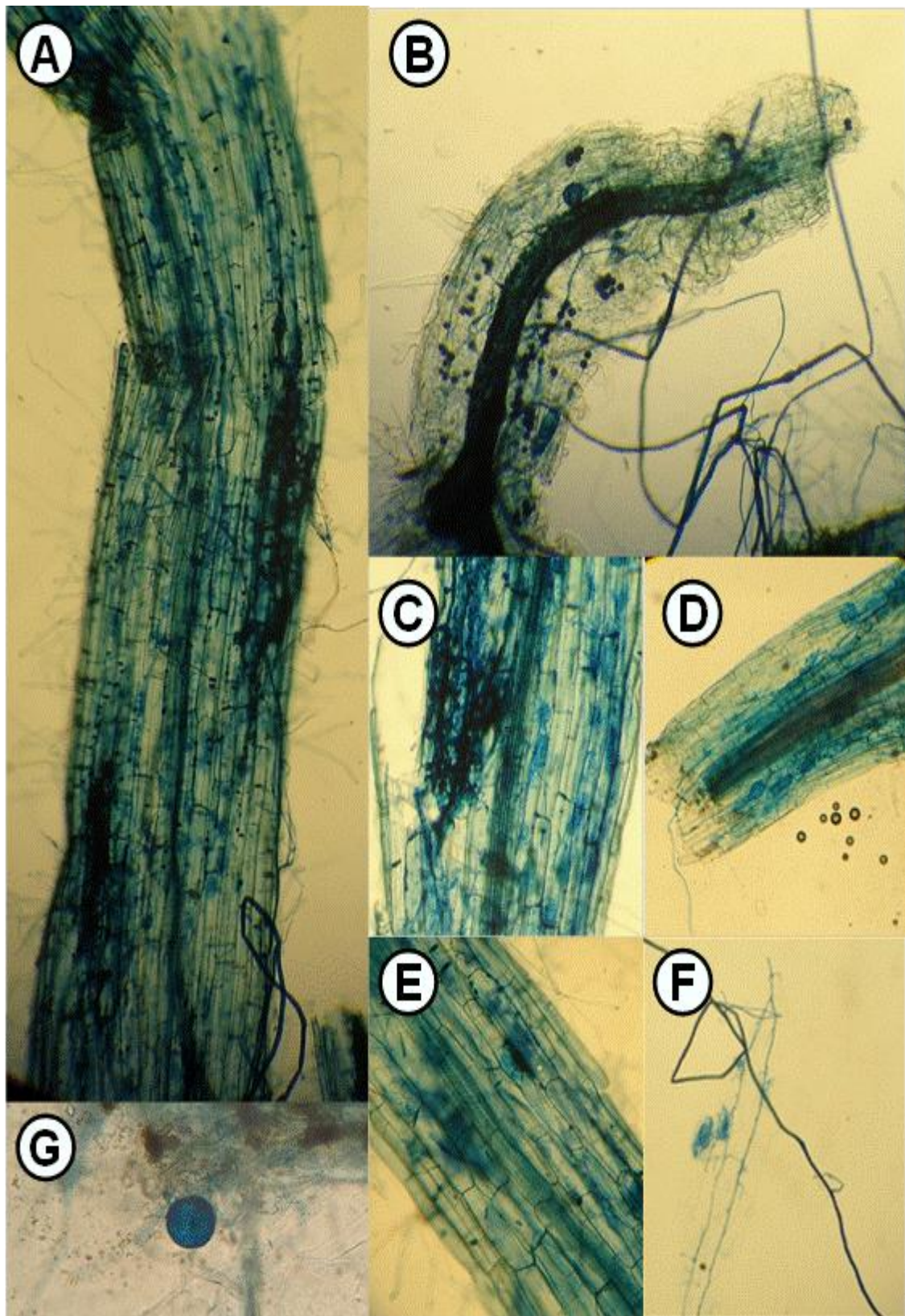
**Figura 9.** Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro mutante super-expressando a  $H^+$ -PPase colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, evidenciando arbúsculos (C), arbúsculos em formação (D) e vesículas (A) e (B).

Nas raízes do tomateiro tipo selvagem também foi observado um grande número de arbúsculos (Figura 9B, Figura 9C, Figura 11F), esporos (Figura 10D, Figura 11B) e vesículas (Figura 11G, Figura 11D, Figura 11E). As hifas demonstraram um comportamento normal e sem engrossamento (Figura 10A), inclusive com formação de apressórios (Figura 10C). Vale ressaltar que as estruturas do fungo tiveram uma distribuição mais homogênea pela raiz (Figura 11A, Figura 11B), indicando uma colonização normal.



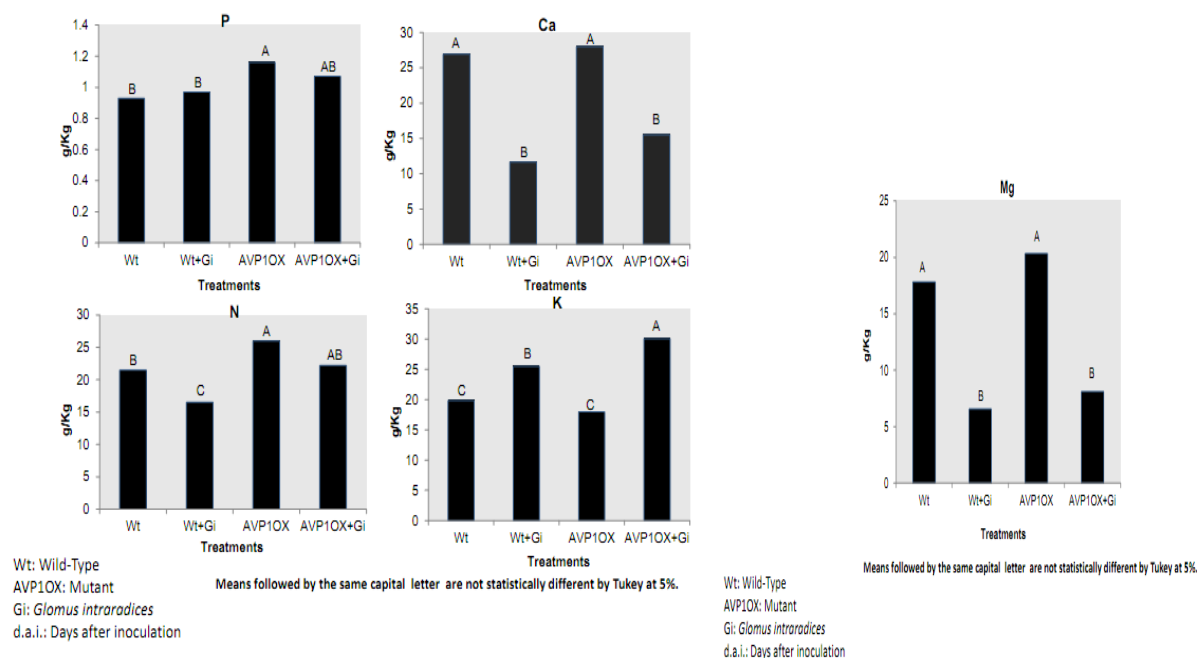


**Figura 10.** Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro tipo silvestre colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, evidenciando: hifas ao redor da raiz (A), arbúsculos (B) e (C) e vesículas e esporos (D).



**Figura 11.** Análise da colonização micorrízica em raízes de tomateiro tipo silvestre colonizadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, evidenciando raízes com arbúsculos, vesículas, hifas e esporos (A), (B), (C) e (D), vesícula isolada (G), vesículas (E) e arbúsculo isolado (F).

### 5.3. Acúmulo de macronutrientes sob condições de stress



**Figura 12.** Acúmulo de macronutrientes sob condições de stress nas plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* (Gi) Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que o FMA aumenta o teor de K e mantém o teor de P e N nas plantas de mutantes de AVP1OX; sendo que o FMA *Glomus intraradices* (Gi), consome o Ca e o Mg, conforme literatura bastante discutida quanto ao metabolismo do cálcio pelos fungos micorrízicos (Lever et al. 1994).

O cálcio faz parte da constituição da parede celular, ativa pontos de crescimento na raiz, a germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico; sua principal função para as micorrizas é que ativa a circulação de graxas nas plantas e estimular seu crescimento (Kanamori et al., 2006); participa de trocas entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; devido a favorecer a deficiência de cálcio em plantas com prejuízo do transporte de carboidratos (Asher et al., 1991).

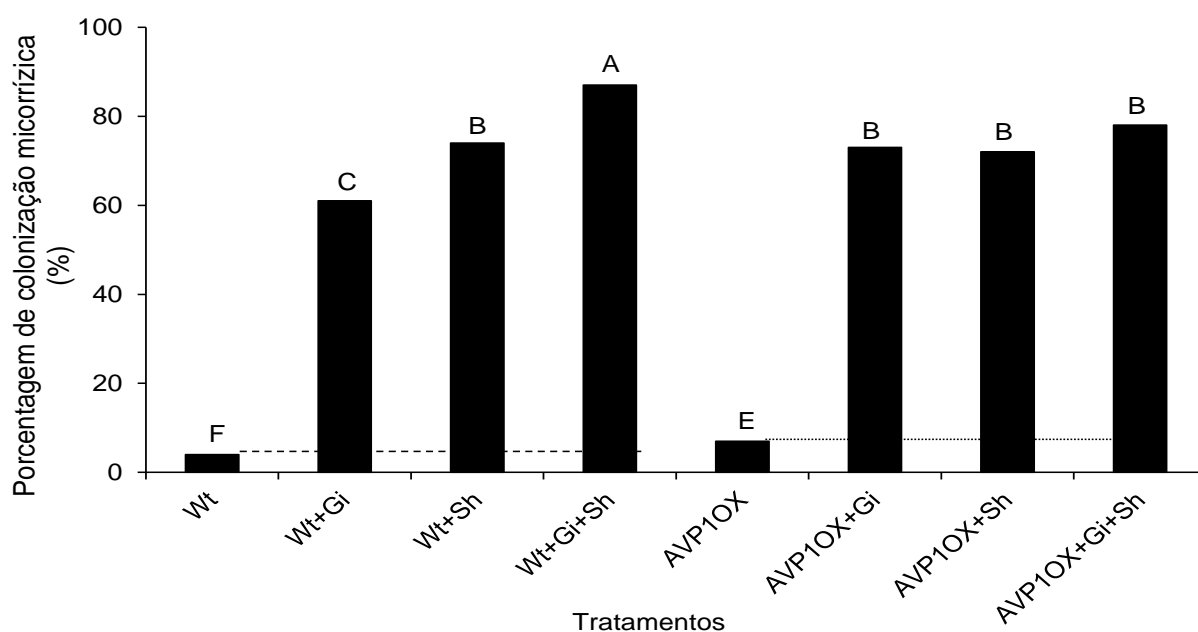
O cálcio aumenta sob condições de stress, sua absorção depende da taxa de transpiração que se encontram aumentada no AVP1 segundo estudos de Gaxiola et al. (2007); e que a síntese de AIA ativa o transporte de cálcio, também aumentado no AVP1 em 50%; informações que confirmam altos níveis de cálcio nos resultados acima.

O aumento de P pelas plantas AVP1 favorecerá uma diminuição na exsudação radicular uma vez que Graham et al. (1981) e Thomson et al. (1986)

verificaram que o aumento de P diminui a exsudação radicular em plantas; justificando também a evidência de inibição na colonização micorrízica, com ênfase em sua intensa dependência (Renella et al. 2011), com maior inibição fúngica sob condições de estresse e menor sob condições normais de nutrição.

#### 5.4. Respostas de Colonização e Crescimento dos mutantes AVP1OX aos tratamentos microbiológicos

A colonização micorrízica aumentou significativamente da inoculação com *Glomus intraradices* à dupla inoculação com *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (Figura 13). Plantas mutantes AVP1OX foram colonizadas na mesma taxa, independente do FMA utilizado (Figura 13). Porcentagens de colonização micorrízica nos controles não-inoculados foram inferiores a 8%, não sendo suficiente para comprometer os resultados.



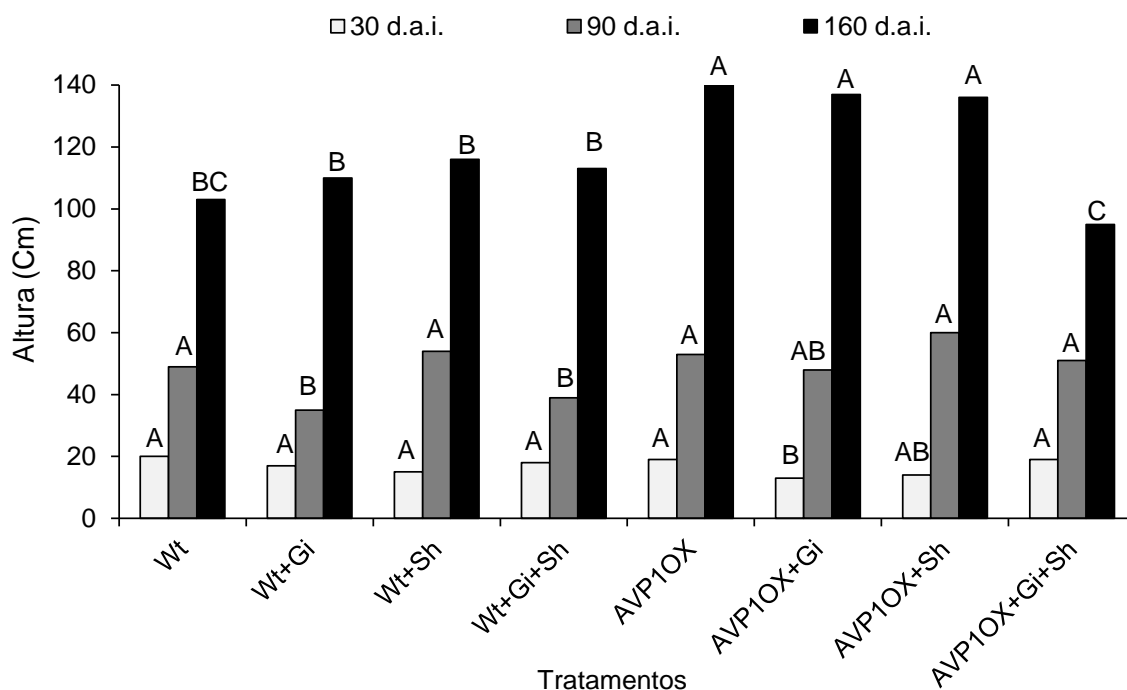
**Figura 13.** Porcentagem de colonização micorrízica de plantas de tomateiro mutantes AVP1OX e tipo silvestre (Wt), inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Plantas de tomateiro AVP1OX não-inoculadas ou inoculadas com *Glomus intraradices* ou *Scutellospora heterogama*, apresentaram as maiores alturas aos 160 dias após à inoculação (Figura 14). A dupla inoculação com *Glomus intraradices* e *Scutellospora heterogama*, causou uma significativa inibição no crescimento das

plantas mutantes AVP1OX, porém não se diferenciando do controle não inoculado (Figura 14).

O gênero *Scutellospora* apresenta a característica de procurar locais na raiz de acúmulo de carbono (Varma, 1998), não encontrando, inicia o desenvolvimento de arbúsculos. Células com deficiência de carbono induzem o colapso destas estruturas, mas com maior frequência de colonização, o que pode estar relacionada também a produção de esporos. Os arbúsculos estão em intenso turnover.

Sabe-se que o gênero *Glomus* são capazes de suportar a grandes variações de pH (Siqueira & Franco, 1988), são dominantes em relação aos demais gêneros; apresentam grande capacidade de esporulação e interessante comportamento estrategista em colonizar regiões abandonadas pelo gênero *Scutellospora* (Varma, 1998), o que pode também ter sido um fator que favoreceu a predominância da colonização do presente experimento (Figura 13, 14).



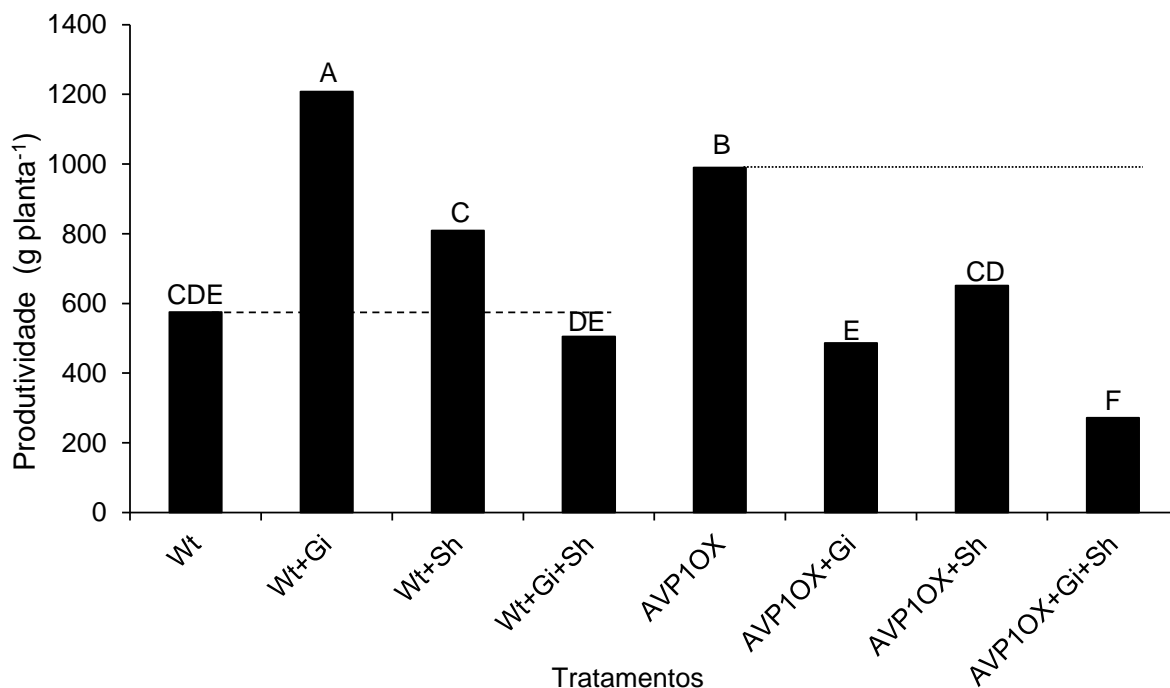
**Figura 14.** Análise temporal do crescimento das plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbustulares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados similares foram observados por Machineski et al. (2009) que encontrou um menor estímulo de crescimento e produção das plantas quando inoculadas com *Scutellospora heterogama* em comparação com espécies do gênero

Glomus (Figura 14), porém com maiores taxas de esporulação. Comportamento similar foi observado anteriormente por Chu et al. (2001). Assim, o maior número de esporos não ocorre necessariamente devido à maior colonização radicular.

A competição por carboidratos radiculares suprimiu arbúsculos em raízes de videira com fitoparasita nematóide *Mesocriconema xenoplax*, sem alterar a colonização total das raízes (Schreiner et al., 2008); o que ocorreu no presente experimento, com a diferença de que a competição seria por um metabolismo acelerado favorecido pelo AVP1OX, abortamento este que ocorre em maior grau com *Scutellospora heterogama* e em menor com *Glomus intraradices*, verifica-se a *Scutellospora* como inóculo de escolha neste trabalho por apresentar um desenvolvimento mais estável sob condições de variação de nutrientes (N e P) ao fungo, confirmado pelo experimentos de Gavito et al, (2008).

## 5.5. Efeito da inoculação de mutantes AVP1OX sob a produtividade em condições normais de nutrição



**Figura 15.** Análise da Produtividade das plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produtividade das plantas silvestres foram fortemente estimuladas pela inoculação com *Glomus intraradices*, superando até mesmo as plantas AVP1OX não-inoculadas (Figura 15). A menor produtividade foi encontrada no tratamento com dupla inoculação em plantas AVP1OX (Figura 15).

Diferenças ecofisiológicas entre as espécies de fungos micorrízicos quanto a respostas às condições ambientais determinam a prioridade de colonização. Aqui, uma clara concorrência de colonização entre os dois FMAs em estudo, na dupla inoculação, pode ter influenciado negativamente na performance das plantas.

A inoculação com *G. intraradices* em plantas de milho resultou, durante os primeiros estádios da colonização, em aumento do ácido indol butírico (AIB), acompanhado por maior atividade sintetase do AIB, sendo que a concentração dessa substância não interferiu na colonização das raízes (Ludwig-Müller et al., 1997). Outras substâncias podem ser produzidas em maior ou menor quantidade, com variações de acordo com o hospedeiro, os FMA e outros fatores.

Amijée et al. (1993) num experimento utilizando plantas de alho poro observaram que a colonização de raízes por *G. mosseae* e ou a adição de P no solo contribuíram para o aumento progressivo da concentração de carboidratos solúveis. A inoculação com *G. etunicatum*, *G. intraradices* e *Glomus sp.* induziram à produção de baixas concentrações de amido nas raízes fibrosas de citros (*Citrus aurantium L.*), indicando maior utilização de carboidratos não-estruturais nas raízes colonizadas por esses fungos, considerados colonizadores competitivos (Graham et al., 1997).

A concentração de açúcares em raízes já foi correlacionada com a colonização das raízes de plantas inoculadas (Douds & Schenck, 1990), o que não ocorreu com a concentração de açúcares solúveis (Rapparini et al., 1994). Em laranja "Cleópatra mandarin" (*Citrus reticulata Blanco*) e em "Limão rugoso" (*Citrus limon Burm.*) inoculados com *G. etunicatum* foram detectados maiores níveis de açúcares redutores em relação ao controle no tratamento em solo com baixo teor de P, mas esse resultado não se manteve em solo com altos níveis de adubação fosfatada (Nemec & Guy, 1982).

É importante destacar que plantas AVP1OX possuem elevadas concentrações de açúcares (Roberto Gaxiola, comunicação pessoal). Isto poderia comprovar as diferenças no perfil de colonização em mutantes AVP1OX.

A influência negativa da elevada concentração de P (> 10 mg de P dm<sup>3</sup> de solo) na efetividade dos FMA, também influenciada pelo genótipo do hospedeiro, tem sido observada em solos de várias localidades (Sylvia et al., 1993). Segundo Bagyaraj. (1991), não é o P do solo que regula a colonização micorrízica, mas a quantidade de P absorvida pela planta. Outros, a exemplo de Araújo et al. (1994), observaram que a efetividade dos FMA sobre tomateiros foi regulada principalmente pelo nível de P disponível no solo.

Há indícios de que o efeito do P sobre a colonização das raízes pelos FMA é indireto, podendo afetar as concentrações de carboidratos nas raízes ou a quantidade de exsudados radiculares, embora haja registros de isolados tolerantes ao P (Bagyaraj, 1991), assim como a outros elementos minerais (Bowen, 1987).



## 5.6. Respostas na atividade de enzimas de estresse oxidativo em mutantes AVP1OX inoculados com FMAs

A verificação de alterações nos mecanismos enzimáticos de defesa ao estresse oxidativo torna-se uma importante ferramenta elucidativa do desempenho do AVP1OX e das micorrizas sob condição normal de nutrição, a fim de confirmar os fatores nutricionais, bem como, inferências nas relações dos tratamentos.

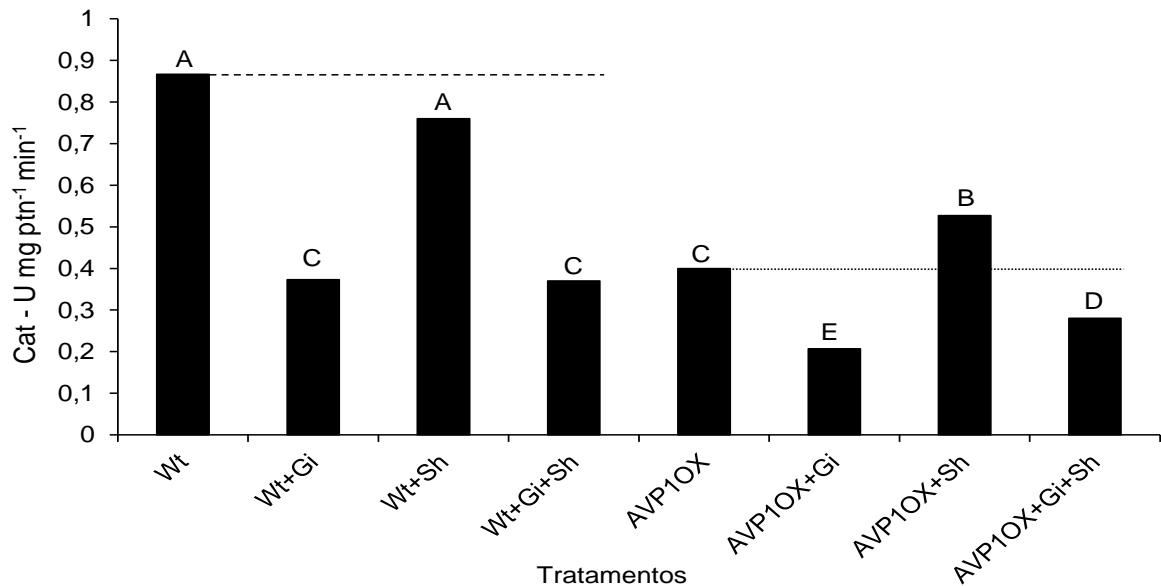
O equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) é fundamental para a manutenção da integridade celular.

Sabe-se que plantas transgênicas apresentam alterações na transcrição de enzimas de estresse oxidativos (Badri et al., 2009), confirmado (Figura 16) pelo presente trabalho ocorrer com o mutante AVP1OX quanto a menor expressão de catalase claro resultado (Figura 16); evidenciando menor mecanismo de defesa pela planta mutante AVP1OX, o que confirma imperável necessidade de inóculo micorrízico que apresentou (Figura 16) capacidade de melhorar estas expressões ao presente mutante (AVP1OX + Sh).

A atividade da catalase foi baixa nos tratamentos inoculados e no mutante AVP1OX (Figura 16), quando comparados ao controle. A promoção da colonização micorrízica por ácido jasmônico poderia ocorrer via regulação oxidativa, que ocorre de forma reduzida em raízes colonizadas por FMAs. Diversas hipóteses foram levantadas, e uma muito interessante foi descrita por Kiriachek et al. (2009). Segundo os autores, análises de hibridização em microarranjos de cDNA mostraram que o ácido jasmônico via seu éster metílico (metil-jasmonato, MeJA), induz o acúmulo de transcritos de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de espécies reativas de oxigênio e na morte celular programada, como catalase, glutathione S-transferase e cisteína protease (Schenk et al., 2000). A ação dessas enzimas, induzidas por jasmonato, reprimiria o efeito inibitório das espécies ativas de oxigênio geradas pelo mecanismo de defesa vegetal sobre os FMAs (Hause et al., 2002, Lambais et al., 2003). Assim verifica-se o quanto a sinalização hormonal pode atuar modulando a transcrição gênica de enzimas de defesa; sabe-se que os FMAs apresentam grande plasticidade em promover a metabolização de sinalizadores hormonais, confirmado neste trabalho o melhor resultado (figura 16) ser AVP1OX+Sh, mais uma vez confirmando a *Scutellospora* como inóculo micorrízico de escolha que favorece maiores expressões de defesa no mutante AVP1OX.

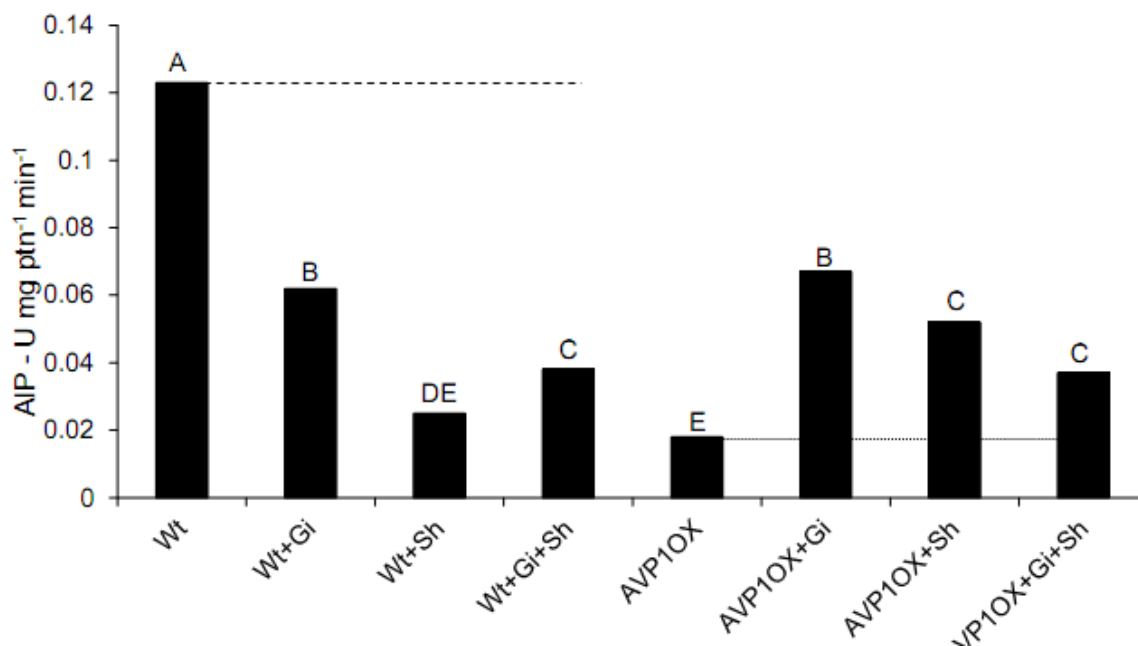
No estudo de Blilou et al., (2000a), foram observados aumentos das atividades de catalase e ascorbato peroxidase em tabaco aos 3 e 5 dias após a inoculação com *Glomus mosseae*. É possível que a indução de atividades de catalase e ascorbato peroxidase nas raízes micorrizadas seja resultado de um estresse oxidativo causado por infecção pelo FMA (Blilou et al., 2000a). Há indícios de que o  $H_2O_2$  resultante do estresse oxidativo ative o ácido benzóico 2-hidroxilase (AB2-Hase), essencial para a síntese de AS (León et al., 1995). Dessa forma, o aumento de espécies ativas de oxigênio resultaria em aumento da atividade de AB2-Hase e, portanto, da síntese de Ascorbato sintase, aumentando a resistência à patógenos nas plantas mutantes inoculadas. Para o crescimento fúngico intrarradicular, a maior atividade de catalase e peroxidase em raízes colonizadas diminuiria o nível de espécies ativas de oxigênio. É possível que a diminuição da atividade da catalase atenua a indução da expressão de outros genes de defesa e isso permitiria maior colonização fúngica (Lambais et al., 2003).

Estes efeitos confirmam mais uma vez a alta plasticidade dos FMAs em favorecer a transdução de sinais como abaixo (figura 16) onde os fatores que inibem a atividade máxima de dada espécie de fungo micorrízico como o *Glomus* inibe a *Scutellospora* quando inoculado juntos no AVP1OX (Figura 16) revertendo efeitos positivos; quanto ao resultado menor do AVP1OX +Gi, é evidente que o *Glomus* não apresenta sua expressão máxima quando aplicado ao mutante, especula-se estar relacionado a fatores bioquímicos (como níveis de flavonóides) (Koltai et al., 2010) podendo estar inibindo sua expressão máxima, confirmando mais uma vez o melhor desempenho da *Scutellospora heterogama* pelo presente trabalho, por aumentar níveis de catalase, que segundo Blilou et al. (2000a) pode ocorrer menores estímulos positivos apenas no período de estabelecimento da colonização, chegando a níveis pouco significativos conforme observa-se comportamento de (Wt+Sh) e (Wt) na (figura 15), em apresentar valores estatisticamente próximos.



**Figura 16.** Atividade da Catalase de plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

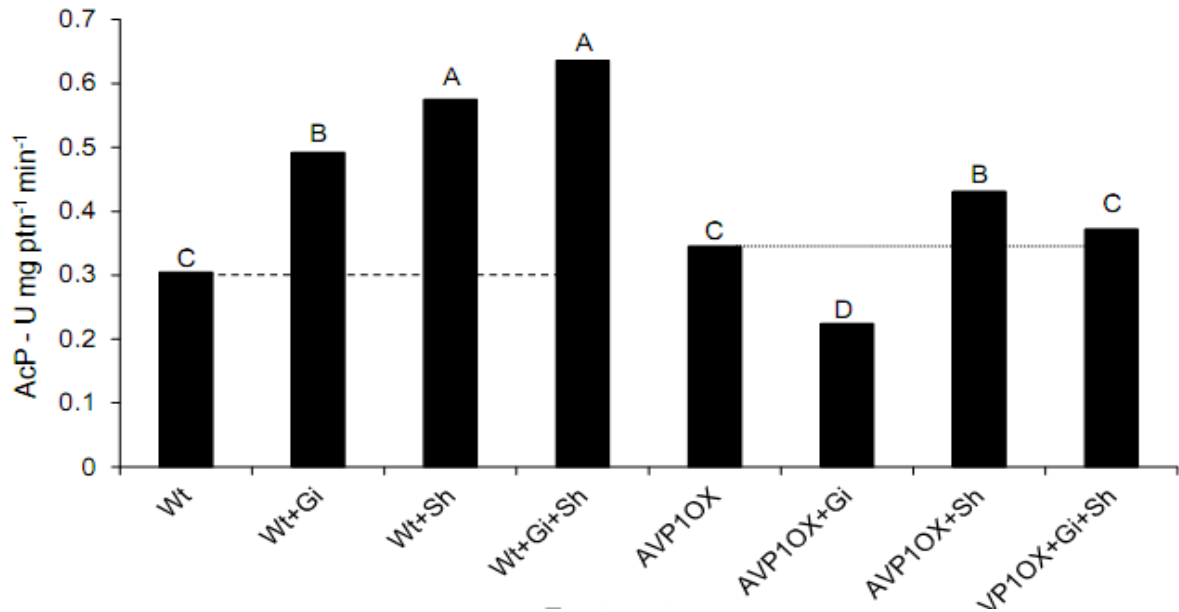
Novamente o resultado do inóculo duplo no mutante não apresenta favorável neste experimento, evidenciando um claro processo inibitório maximizado pela associação, e também novamente menor desempenho do gênero *Glomus*, devido ao claro processo inibitório sobre sua expressão no AVP1OX (figura 16) levantada pelo presente experimento.



**Figura 17.** Atividade da Fosfatase Alcalina em plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nahas et al. (1994) verificou uma correlação positiva com matéria orgânica, fosfatase ácida e alcalina e não significativa com fósforo orgânico, fósforo total e pH, em fungos coletados da camada de 0-15 cm do solo; e nenhuma correlação com as bactérias quanto a estes fatores. Podemos inferir do experimento de Nahas et al. (1994) que a capacidade diferenciada que os fungos micorrízicos tem em manifestar o aumento da expressão de enzimas, como verificado (Figura18) onde o *Glomus* apresenta equivalente desempenho no silvestre (Wt), confirmando apresentar clara expressão sobre aumento de fosfatase alcalina. Sabe-se que a fosfatase alcalina difere da ácida devido sua característica de ocorrer em diferentes pHs, podendo o resultado acima em comparação com os resultados da fosfatase ácida (figura 17), ser confirmada pelos resultados bem contrários em relação à relevar as diferentes espécies dos fungos quanto sua melhor atividade em função da especificidade à determinado pH, conforme verificado por Souza et al., (2000).

Segundo Joner et al. (2000) em revisão a fosfatase alcalina aumentada em FMAs representa início de colonização servindo como indicador de atividade metabólica e resistência contra tolerância a fatores estressantes como Cobre (Cu) e outros fatores abióticos.



**Figura 18.** Atividade da Fosfatase Ácida em plantas de tomateiro AVP10X e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produção de fosfatase ácida no AVP10X evidenciou poder ser incrementada mais uma vez pelo inóculo micorrízico da *Scutellospora heterogama* evidenciado no presente experimento (figura 18), por apresentar-se estatisticamente equivalente ao silvestre inoculado (Wt+Gi), favorecendo a planta de forma superior ao controle (silvestre-Wt).

Segundo Jain et al. (2007) o que controla a captação de P (fósforo) é a oscilação de açúcares e que as ações de açúcar e auxinas em respostas ao P não estão bem estabelecidas, sabe-se que o AVP10X apresenta altos níveis de sacarose (Gaxiola, comunicação pessoal) justificando a variação nos níveis de respostas à fosfatases ácidas pelos fungos micorrízicos no AVP10X (figura 18); especulando-se ser por alterações nos níveis de açúcares na plantas devido a interações fungo/planta que poderão ser delineadas por futuros experimentos.

O fósforo só é percebido pela planta se houver baixas concentrações de citocininas (Franco-Zorilla et al., 2002); assim podemos sugerir trabalhos futuros que possam delinear tais efeitos entre mutantes de citocinina em presença de fósforo e AVP1 com FMAs, resultando em continuação deste trabalho, que irá confirmar uma possível contribuição de citocininas pelos fungos *Glomus* e *Scutellospora*, justificando parte deste comportamento de destaque da atividade *Scutellospora* com

AVP1, bem como, o trabalho de Slezak et al. (2000) que evidenciou que o aumento de citocinina aumenta a inibição de arbúsculos.

Lambais et al. (2003) evidenciou que o desbalanço de fitohormônios alteram a expressão de defesa da planta em presença de P, evidenciando também, que o ABA (ácido abscísico) diminui etileno e que o etileno diminui a colonização pelo FMA, confirmado por Ishii et al. (1996), tais dados mais uma vez justificam as variações dos níveis de fosfatases ácidas encontradas (figura 18) nos mutantes inoculados.

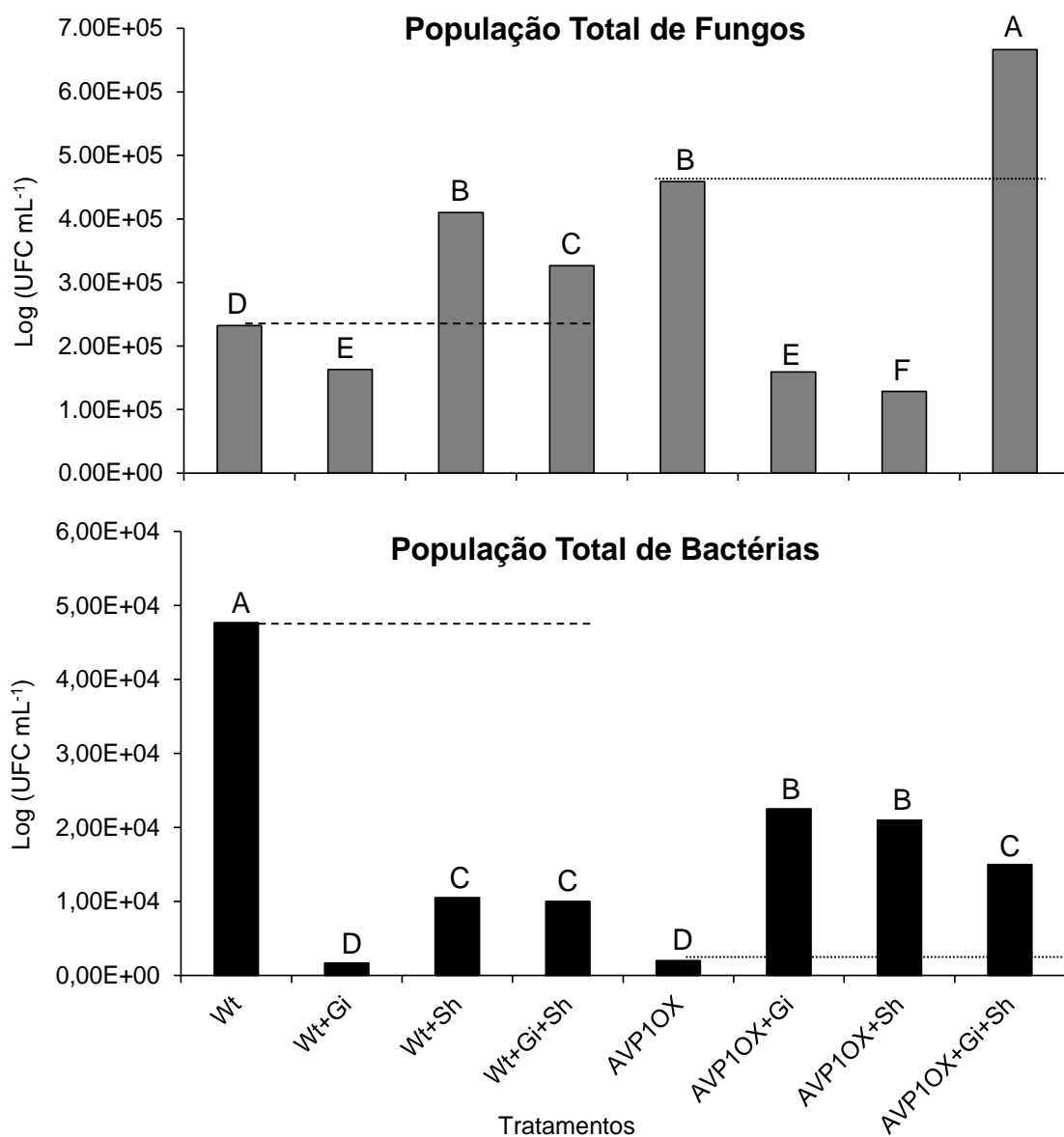
Sugere Lambais et al. (2003), que a catalase pode participar do controle do crescimento intraradicular do fungo quanto ao seu desenvolvimento, em altas concentrações de P; detectado ao isolar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próximo a lamela média e a hifa, favorecendo o aumento de catalase, que aumenta a beta 1-3 gluconase e quitinases que podem digerir a parede celular da célula vegetal e facilitar a colonização do FMA.

Atividade da fosfatase ácida aumenta nos mutantes AVP1 (figura 18), apresentando a *Scutellospora heterogama* os melhores resultados, confirmando assim sua capacidade de estabelecimento em colonização, segundo experimentos de Lambais et al. (2003) e revisão de Joner et al. (2000).

## **5.7. Contagem da População mediana de fungos e bactérias na rizosfera de plantas mutantes AVP1OX**

O presente trabalho avaliou as alterações na microbiota da rizosfera de raízes de tomateiro. Segundo Berbara et al. (2006) os valores de biomassa microbiana encontrados na literatura provavelmente estão subestimados; devido aos métodos que discriminam essa biomassa micelial. A técnica de respiração induzida (Anderson & Domsch, 1978) é aplicada a amostras de terra destorroadas e peneiradas, destruindo hifas de FMAs e suas conexões às plantas, destruindo assim as únicas fontes de C, uma vez que, estes fungos são incapazes de mobilizar açúcares que não seja os deslocados por plantas, justificando também a inexpressão dos métodos de indução por adição de sacarose ao substrato.

Considerar a avaliação da biomassa microbiana como indicador de fertilidade biológica do solo requer métodos mais precisos (Berbara et al., 2006).



**Figura 19.** População total de fungos e bactérias na rizosfera de plantas de tomateiro AVP1OX e tipo silvestre (Wt) inoculadas ou não isoladamente com os fungos micorrízicos arbusculares *Glomus intraradices* (Gi) ou *Scutellospora heterogama* (Sh), ou com a dupla inoculação de *Glomus intraradices* + *Scutellospora heterogama* (+Gi+Sh). Médias seguidas por uma mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Sabe-se que a predominância fungo: bactéria é mediada pelo tipo de micorriza que coloniza a planta hospedeira (Joergensen & Witchern, 2008), e que esta micorriza é controlada pelo status de nutrientes do solo (Lambers et al., 2008), tais fatos conduzem a diferentes respostas dos FMAs (figura 18) em inibir (FMAs + Wt) ou estimular (FMAs + AVP1OX) as respostas à bactérias e aumentar fungos (Wt + FMAs) ou diminuir aos mutantes (FMAs+AVP1OX), conforme resultado do presente trabalho (figura 19).

A adição de P é esperado alterar a composição da comunidade diretamente com um aumento na abundância de bactéria em relação à fungos (Grayston et al.,

2004) e por inibir os FMAs (Aliasharзад et al., 2001; Kahiluoto et al., 2009), estes dados também estão sob a ação da expressão hormonal que interage sobre a sensibilidade da planta ao P, conforme experimento de Franco-Zorilla, (2002); assim podemos concluir que a relação entre microorganismos é tênue em relação nutrição/hormônios, onde há necessidade de definir qualitativa e quantitativamente estes limites; neste experimento podemos apenas evidenciar que o AVP1OX favorece mais fungos que bactérias e que as micorrizas não associadas corrigem tais efeitos e quando inoculadas conjuntamente apresentam esse comportamento invertido.

Os compostos de carbono secretados pelas raízes agem como substratos para os microorganismos da rizosfera (FMAs) (Ramos et al., 2009), onde evidencia-se que a matéria Orgânica (MO) favorece a colonização aumentando as populações de esporos de FMA relacionadas ao nível de aplicação de adubos orgânicos, melhoram o desenvolvimento micorrízico nos solos tropicais (Bagyaraj, 1991), sabe-se que os fungos micorrízicos formam uma rede de glomalina que retém a microbiota fornecendo nutrientes, justificando as micorrizas aumentarem outros fungos conforme (Figura 19). No entanto, nem sempre são evidenciadas correlações entre conteúdo de matéria orgânica e a colonização (Sylvia & Williams, 1992), evidenciando que outros fatores também afetam a esporulação; diante de intrincada rede de interrelações o presente resultado evidencia a necessidade de métodos mais desenvolvidos e até mais específicos para delinear os efeitos da microbiota no solo, devido aos contraditórios resultados encontrados na literatura científica atual, e na (figura 19) onde resultados continuam evidenciando tais oscilações de interações entre fungos/bactérias e fungos micorrízicos.

Seria interessante avaliar primeiro a microbiota presente e depois a relação entre elas, pois que existem bactérias que vivem dentro dos esporos das micorrizas e que podem não serem detectadas pelos métodos usuais e atuais.

Reis et al. (1994) encontrou *Acetobacter diazotrophicus* no mesófilo de folhas verdes, secas, apoplasto e xilema; assim podemos verificar o quanto pode variar a ecologia e a relação entre plantas/microorganismos; onde o AVP1OX por aumentar o crescimento e o número de folhas na planta favorece uma maior serrapilheira que poderá estar acompanhada de maior quantidade de bactérias, assim podemos observar o quanto é importante avaliar a presença de determinados microorganismos, uma vez que estes por esta presença poderem se relacionar.



Assim podemos verificar que esses resultados podem não estar adequados por necessitar de melhores metodologias.

Niklaus et al. (2003) verificou um aumento na dominância fúngica sob elevação de CO<sub>2</sub>, enquanto que, Sonnemann e Wolters (2005), notaram um decréscimo nesta dominância fúngica e bacteriana. Castro et al. (2010) concluíram que esta dominância depende de muitos fatores, tipo de solo, temperatura, nutrientes e interações; justificando assim o presente trabalho que evidencia a modificação desta comunidade em relação a redistribuição de nutrientes favorecida pelo AVP e em condições normais de nutrição (Figura 19).

É importante destacar que o potencial de dominância do fungo:bactéria também é atribuída à recalcitrância da planta bem como o aumento na atividade das raízes (Kandeler et al., 1998), o presente experimento apresentou a predominância fúngica no AVP1OX e diminuição das bactérias, que pode ser corrigida com a adição de inóculos de micorríza; onde a gênero *Scutellospora* mais uma vez se destaca (figura 19).

Estudo revelou que tanto as leveduras de ascomicetos quanto de basidiomicetos são capazes de estimular o crescimento de FMAs (Fracchia et al., 2003), enfatizando o resultado acima (Figura 19) onde no silvestre (Wt) os fungos micorrízicos aumentam os fungos; tal fato, confirma em como o FMA interage em aumentar outras microbiotas, e nos retorna com o resultado inverso no AVP1OX inoculado, podendo ser justificado por competição de recurso, sendo o aumento dominante de fungos favorecido pela associação das duas espécies, *Glomus* e *Scutellospora* que pode evidenciar uma possível ação invasiva desfavorável à planta que também se verifica pelo gráfico (figura 14) de crescimento e (figura 15) produtividade, bem como o gráfico (figura 16) da atividade da catalase estar estatisticamente menor na dupla inoculação/AVP1OX, enfatizando a ação sinérgica dos fungos micorrízicos quando associados em relação à planta mutante.

O resultado deste trabalho (figura 19) quanto às micorrizas em corrigir o efeito do AVP1OX por favorecerem um aumento das bactérias ao mutante; destaca novamente a *Scutellospora* e também o *Glomus*, verificando novamente a desfavorável interação de duplo inóculo pelo mutante, possível competição por recurso.

## 6. CONCLUSÕES

Plantas mutantes superexpressando a H<sup>+</sup>-pirofosfatase demonstraram melhor crescimento quando inoculadas sob stress e condições normais de nutrição. Evidenciamos uma modificação na população microbiana da rizosfera e especulamos que a exudação e a redistribuição de nutrientes seja influenciada no mutante AVP1OX e inoculado. Estudos são necessários no que diz respeito à simbiose: Comportamento anormal do fungo em raízes do mutante; evidenciado no presente trabalho ser relevante principalmente com duplos inóculos.

## 7. REFERÊNCIAS

- Akiyama K., Hayashi H.** (2006) *Strigolactones: Chemical signals in fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots*. *Ann. Bot.* 97: 925-931.
- Aliasghar zad N., Saleh Rastin N., Towfighi H., Alizadeh A.** (2001) *Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz plain in relation to some physical and chemical properties of soil*. *Mycorrhiza*, 11: 119-122.
- Amijé F., Stribley D. P., Tinker P. B.** (1993) *The development of endomycorrhizal root systems. VIII effects of soil phosphorus and fungal colonization on the concentration of soluble carbohydrates in roots*. *New Phytologist*, 123: 297–306.
- Anderson I. C. & Domsch K. H.**(1978) *A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils*. *Soil Biology Biochem*, 10: 215-221.
- Antursson V., Finlay R. D., Jansson J. K.** (2006) *Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth*. *Environmental Microbiology*, 8: 1-10.
- Araújo A. P., Silva Emr. & Almeida D. L.** (1994) *Efetividade de fungos endomicorrízicos em tomateiro em diferentes níveis de fósforo no solo*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18: 193–199.
- Asher C. J.** (1991) *Beneficial Elements, Functional Nutrients, and possible new Essential Elements*. In: J. J. **Mortiedt P. M., Giordano & Lindsay W. L.** (eds.) *Micronutrients*. In: *Agriculture*, 2 ed., Soil Science Society of America. Madison, p. 703-723.
- Badri D. V., Quitana N., Kassis E. G. E, Kim H. K., Choi Y. H., Sugiyama A., Verpoorte R., Martinoia E., Manter K. D., Vivanco J. M.** (2009) *An ABC transporter mutation alters root exudation of phytochemicals that provoke an overhaul of natural soil microbiota*. *Plant Physiology*, 151: 2006-2017.

**Bagyaraj D. J.** (1991) *Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae*. In: **Arora D. K., Rai B., Mukerji K. G. & Knudsen G. R.** (Eds.) *Handbook of applied micology: soil and plant*. (1): 4-34.

**Bago B., Azcon-Aguilar C., Goulet A., Piche Y.** (1998b) *Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi*. *New Phytologist*, 139: 375-388.

**Bago B., Azcon-Aguilar C., Piche Y.** (1998a) *Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions*. *Mycologia*, 90: 52-62.

**Bago B., Pfeffer PE, Shachar-Hill Y.** (2000) *Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas*. *Plant Physiology*, 124: 949-57.

**Baptista M., Siqueira J.** (1994) *Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea**. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6: 127-134.

**Barea J. M., Azcón R., Azcón-Aguillar C.** (2004) *Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rizobactéria*. In: **Varma A., Annott L., Werner R., Hampp** - eds. *Plant surface Microbiology*, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 351-371.

**BARRED, A. J.** (1972) *Lysosomal enzymes*. In: **Dingle, J. T.** (Ed.), *Lysosomes: A Laboratory Handbook*. North- Holland, Amsterdam, p. 46-135.

**Batten K. M, Scow K. M, Davies K. F, Harrison S. P.** (2006). *Two invasive plants alter soil microbial community composition in serpentine grasslands*. *Biol Invasions*, 8: 217-230.

**Battisti D. S., Naylor R. L.** (2009) *Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat*. *Science*, 323: 240-244.

**Baudoin E., Benizri E., Guckert A.** (2002) *Impact of growth stages on the bacterial community structure along maize roots by metabolic and genetic fingerprinting*. Appl. Soil Ecology, 19: 135-145.

**Becard G., Kosuta S., Tamasloukht M., Sejalondelmas N., Roux C.** (2004) *Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction*. Canadian Journal of Botany Ottawa, 82: 1186-1197.

**Berbara R. L. L., Souza F. A., Fonseca H. M. A. C.** (2006) *Fungos micorrízicos arbusculares: Muito além da nutrição*. Nutrição mineral das Plantas SBCS. p. 432.

**Beutler E.**(1975) *A Manual of Biochemical Methods*. 2<sup>a</sup> ed.: New York, Grune & Stratton.

**Blee K. A, Anderson A. J.** (1998) *Regulation of arbuscular formation by carbon in plant*. Plant Journal, 16: 523-530.

**Blilou I., Ocampo J., Garcia-Garrido J.** (2000<sup>a</sup>) *Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with arbuscular mycorrhizal Glomus mosseae*. Mycol. Res. 104: 722-725.

**Body V. U., Balakrishana A. N., Bagyaraj D. J.** (2008) *Interaction between Glomus mosseae and soil yeasts on growth and nutrition of cowpea*. Microbiological Research, 163: 693-700.

**Bonfante P., Perotto S.** (1995) *Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants*. New Phytologist, 130: 3-21.

**Botha A.** (2006) Yeast in soil. In: **Rosa C. A., Péter G.** *The Yeast Handbook; Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*: Springer-Verlag, Berlin, p. 221-240.

**Botha A.** (2011) *The importance and ecology of yeasts in soil*. Review, Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa, Soil Biology & Biochemistry, 43: 1-8.

Fonte: journal homepage: [www.elsevier.com/locate/soilbio](http://www.elsevier.com/locate/soilbio).

**Bowen G. D.** (1987) *The biology and physiology of infection and its development*. In: **Safir, GR.** (Ed.) *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. Boca Raton., CRC Press. p. 27-57.

**Bruinsma M., Kowalchuk G. A., Veen J. A. Van.**(2003) *Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil*. *Biology and Fertility of Soils*, **37**: 329-337.

**Búee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Bécard G.** (2000) *The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates*. *Mol. Plant Microbe Interact*, **13**: 693-698.

**Carystinos G. D., Macdonald H. R., Monroy A. F., Dhindsa R. S., Poole R. J.** (1995) *Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice*. *Plant Physiology*, **108**: 641- 649.

**Castro H. F., Classen A. T., Austin E. E., Norby R. J., Schadt C. W.** (2010) *Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers*. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**: 999-1007.

**Chabaud M., Vnerrd C., Defaux-Petras A., Becard G., Barker D.** (2002) *Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi*. *New Phytologist*, **156**: 265-273.

**Chu E.Y. et al.** (2001) *Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de gravioleira em solo fumigado e nativo*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **36**(4): 671-680.

**Cordell D., Drangert J.O., White, S.** (2009) *The story of phosphorus: global fsecurity and food for thought*. *Global Environmental Change-Human and Po Dimensions*, **19**: 292-305.

**Douds J.R., D.D. & Schenck N.C.**(1990) *Relationships of colonization and sporulation by mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrates contents.* New Phytologist, 116: 621-627.

**Elias K. S., Safir G. R.** (1987) *Hiphal elongation of Glomus fasciculatus in response to root exudates.* Apply Environmental Microbiology, 53: 1928-1933.

**Ferrol N., Pozo M. J., Antelo M., Azcón-Aguilar C.** (2002) *Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPASE gene expression in tomato plants.* J. Exp. Bot. 53: 1683-1687.

**Fester T., Strack D., Hause B.** (2001) *Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development.* Planta, 213: 864-868.

**Fitter A. H., Moyersoen B.** (1996) *Evolutionary trends in root-microbes symbioses.* Philosophical. Transation of the Royal Society of London series B, London, 351: 1367-1375.

**Fitter A. H., Graves J. D., Walkins N. K., Robinson D., Scrongeour C.** (1998) *Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas.* Funct Ecology, 12: 406-412.

**Fracchia S., Godeas A., Scervino J. M., Sampedro I., García-Romera I.** (2003) *Interaction between the soil yeast Rhodotorula mucilaginosa and the arbuscular mycorrhizal fungi Glomus mosseae and Gigaspora rosea.* Soil Biology and Biochemistry, 35: 701-707.

**Franco-Zorrila J. M., Martin A. C., Levrya A., Paz-Ares J.** (2005) *Interaction between phosphate starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3.* Plant Physiology, 138: 847–857.

**Gaxiola R. A., Rao R., Sherman A., Grisafi P., Alper S. L., Fink G. R.** (1999) *The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast.* Proceedings of the National Accademy of Sciences USA, 96: 1480-1485.

**Gaxiola R. A., Fink G. R., Hirschi K. D.** (2002) *Genetic Manipulation of Vacuolar Proton Pumps and Transporters* Plant Physiology, 129: 967-973.

**Gaxiola R. A. et. al.** (2005) *Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates Auxin-Mediated Organ Development.* Science, 310: 121-125.

**Gaxiola R. A., Palmegren M. G., Schumacher K.** (2007) *Plant Proton Pumps.* FEBS Letters, 581: 2204-2214.

**Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B., Gianinazzi S.** (1989) *In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids.* Symbiosis, 7:243-255.

**Gianinazzi-Pearson V., Aenould C., Outfattole M., Arango M., Gianinazzi S.** (2000) *Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco.* Planta, 211: 609–613.

**Giovanetti M., Mosse B.** (1980) *An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection roots.* New Phytologist Lancaster, 84: 489-500.

**Giovanetti M., Sbrana C., Citternesi A.S., Avio L.** (1996) *Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi.* New Phytologist, 133: 65-71.

**Giri B., Giang P. H., Kumari R., Prasad R., Varma A.** (2005) *Microbial diversity.* In: soils. **Buscot F., Varma S.;** eds, *microorganisms. In soils: Roles in genesis and functions.* Springer-Verlag, Heidelberg, p. 195-212.

**Gordon-Weeks R., Steele S. H., Leigh R. A.** (1996) *The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H<sup>+</sup>-pumping inorganic pyrophosphatase (studies using ligand protection from covalent inhibitors).* Plant Physiology, 111: 195-202.



**Graham J., Leonard R., Mengle J. A.** (1981) *Membrane mediated decrease in root exsudation responsible for phosphorus-inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation.* Plant Physiology, 68: 648-652.

**Graham J. H., Duncan L. W., Eissenstat D. M.** (1997) *Carbohydrate allocation patterns in citrus genotypes as affected by phosphorus nutrition, mycorrhizal colonization and mycorrhizal dependency.* New Phytologist, 135: 335-343.

**Graham J. H.** (2000) *Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis in agroecosystems.* In: Podila GK. & Douds DD, eds. *Current advances in mycorrhizae research St. Paul, APS Press.* p. 127-140.

**Grace C., Stribley D. P.**(1991) *A Safer Procedure for routine staining of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi.* Mycology, Res. 95: 1160-1162.

**Grayston S. J., Campbell C. D., Bardgett R. D., Mawdsley J. L., Clegg C. D., Ritz K.** (2004) *Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques.* Applied Soil Ecology, 25: 63-84.

**Harley J. L., Smith S. E.** (1983) *Mycorrhizal symbiosis.* Academic Press London, p. 483.

**Hause B., Maier W., Miersch O., Kramell R., Strack D.** (2002) *Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots.* Plant Physiology, 130: 1213-1220.

**Hayman D. S.**(1983). *The Physiology of VA endomycorrhizal symbiosis.* Canadian Journal of Botany, 61: 944-963.

**Hepper C. M.** (1984) *Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi.* Mycorrhiza, p. 95-112.

**Holland E. A., Coleman D. C.** (1987) *Litter placement effects on microbial and organic-matter dynamics in an agroecosystem.* Ecology, **68**: 425-433.

**Hunt H. W., Coleman D. C., Ingham E. R., Ingham R. E., Elliott E. T., Moore J. C., Rose S. L., Reid C. P. P., Morley C. R.** (1987) *The detrital food web in a shortgrass prairie*. *Biology and Fertility of Soils*, **3**: 57-68.

**Ikeda S. et al.** (2008) *Microbial community analysis of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes*. *Appl. Environ. Microbiology*, **74**: 5704-5709.

**Ikeda S. et al.** (2010a) *Community shifts of soybean stem-associated bacteria responding to different nodulation phenotypes and N levels*. *I.S.M.E. J.* **4**: 315-326.

**Ikeda S. et al.** (2010b) *Community and genome-based views of plant associated bacteria: Plant-genome interactions in soybean and rice*. *Plant Cell Physiology*, **51**(9): 1398-1410.

**Innes L., Hobbs P. J., Bardgett R. D.** (2004) *The impacts of individual plant species on rhizosphere microbial communities in soils of different fertility*. *Biol Fertil Soils*, **40**: 7-13.

**INVAM.** *International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi* (2001). <http://invam.caf.wvu.edu/mycinfo/methods/cultures/monosp.htm>. Acesso em março de 2010.

**Ishii T., Shrestha Y. H., Matsumoto I. & Kadoya K.** (1996) *Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliolate orange roots*. *J. Japan. Soc. Hortic, Sci.* **65**: 525-529.

**Jain A., Poling M. D., Karthikeyan S. A., Blakeslee J. J., Peer W. A., Titapiwatanakun B., Murphy A. S., Raghothama K. G.** (2007) *Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **144**: 232-247.

**Jha B., Thakur M. C., Gontia I., Albrecht V., Stoffels M., Schmid M., Hartmann A.** (2009) *Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars*. *European Journal of Soil Biology*, **45**: 62-72.

**Johansen A., Finlay R. D., Olsoon P. A.** (1996) *Nitrogen metabolism of the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 133: 705-712.

**Joergensen R. G., Wichern F.** (2008) *Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil*. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 2977-2991.

**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.

**Kahiluoto H., Ketoja E., Vestberg M.** (2009) *Contribution of arbuscular mycorrhiza to soil quality in contrasting cropping systems*. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 134: 36-45.

**Kanamori N. et al.** (2006) *Nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis* *Proc. National Acad Science*. 103: 359-364.

**Kandeler E., Tschirko D., Bardgett R. D., Hobbs P. J., Kampichler C., Jones H.** (1998) *The response of soil microorganisms and roots to elevated CO<sub>2</sub> and temperature in a terrestrial model system*. *Plant and Soil*, 202: 251-262.

**Kasai M., Nakamura N., Kudo N., Sato H., Maeshima M., Sawada S.** (1998) *The activity of the root vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients*. *Plant Cell Physiology*, **39**: 890-894.

**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.

**Klironomos J. N., Kendrick W. B.** (1996) *Palatability of microfungi to soil arthropods in relation to the functioning of arbuscular mycorrhizae*. *Biology and Fertility of Soils*. 21: 43-52.

**Klironomos J.** (2002) Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417: 67-70.

**Koch K, Mengel K.** (1977) *Effect of K on N utilization by spring wheat during grain protein formation.* *Agronomy Journal*, **69**: 477-487.

**Kohler J., Caravaca F., Carrasco L., Roldan A.** (2007) *Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of Lactuca sativa.* *Applied Soil Ecology*, 35: 480-487.

**Koltai H. et al.** (2010) A tomato strigolactone-impaired mutant displays aberrant shoot morphology and plant interactions. *Journal of Experimental Botany*, 1-12.

**Koske R. E. & Gemma** (1989). *A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas.* *Mycological Research*, 92: 486-505.

**Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gouch C., Denarie J., Barker D. G., Becard G.A.** (2003) *Diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosisspecific MtENOD11 expression in roots of Medicago truncatula.* *Plant Physiology*, 131: 952-962.

**Krajinski F., Hause B., Gianninazzi-Pearson V., Franken P.** (2002) *Mtha1, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from Medicago truncatula, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue.* *Plant Biology*, 4: 754–761.

**Ladygina N., Henry , Kant M. R., Koller R., Reidinger S., Rodriguez A., Saj S., Sonnemann I., Witt C., Wurst S.** (2010) *Additive and interactive effects of functionally dissimilar soil organisms on a grassland plant community.* *Soil Biology & Biochemistry*. 42: 2266-2275.

**Lambais M. R., Mehdy M. C.** (1996) *Soybean roots infected by Glomus intraradices strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and b- 1,3 - glucanase expression.* *New Phytologist*, 134: 531-538.

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

**Lambais M. R.** (2009) *Revisão: Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares*. *Revista Brasileira da Ciência do Solo*. 33(1): 1-16.

**Lambers H., Raven J. A., Shaver G. R., Smith S. E.** (2008) *Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age: Trends*. *IN: Ecology & Evolution*. 23: 95-103.

**Leigh J., Hodge A., Fitter A. H.**(2008) *Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material*. *New Phytologist*, 181: 199-207.

**Léon J., Lawton M. A. & Raskin I.** (1995) *Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco*. *Plant Physiology*, 108: 1673-1678.

**Lever M. C., Robertson B. E. M., Bucham A. D. B., Miller P. F. P., Gooday G. W., Gow N. A. R.** (1994) *Ph and Ca<sup>+++</sup> dependent galvanotropism of filamentous fungi: Implications and mechanisms*. *Mycology Res*. 98: 1301-1364.

**Linderman R.G.** (1988) *Mycorrhizal interactions with rizosphere microflora: the micorrizosphere effect*. *Phytopatology*, 78: 366-371.

**Linderman R. G.** (1994) *Role of VAM fungi on biocontrol*. In: **Pfleger F.L., Linderman R. G.** *Mycorrhizae and Plant Health*: St. Paul: A.P.S Press, p.1-25.

**Ludwig-Müller J., Kaldorf M., Sutter E. G., Epstein E.** (1997) *Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays L.*) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices**. *Plant Science*, 125-153.

**Machineski O., Bolota E. L., Colozi A. F., Andrade D. S., Souza J. R. P.** (2009) *Crescimento de mudas de peroba rosa em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares*. *Ciência Rural. Nota Fitotecnia*. (39): 2. 12-19.

**Mäder P, Fliessbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U.** (2002) *Soil fertility and biodiversity in organic farming*. Science. 296: 1694-1697.

**Mäder P. et al.**(2011) *Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat, rice and wheat-black gram rotations in India*. Soil & Biochemistry, 43: 609-619.

**Micallef S. A., Shiaris M. P., Colon-Carmona A.** (2009) *Influence of Arabidopsis thaliana accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates*. Journal Exp. Botany, 60: 1729-1742.

**Milling A., Smalla K., Mair F. X., Schloter M., Münch 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: 23-29.

**Mohammad A., Mitra B. & Khan A. G.**(2004) *Effects of sheared-root inoculation of Glomus intraradices on wheat grown at different phosphorus levels in the field*. Agric. Ecosyst. Environ, 103: 245-249.

**Mutphy P. J., Langridge P., Smith S. E.** (1996) *Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of Hordeum vulgare by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices*. New Phytologist, 135: 291–301.

**Nacry P., Canivenc G., Muller B, Azmi A, Onckelen H. V., Rossignol M., Dourmas P.** (2005) *A role for auxin redistribution in the response of the root system architecture to phosphate starvation in Arabidopsis*. Plant Physiology, 138: 2061-2074.

**Nagahashi G., Douds D. D.** (1999) *Rapid and sensitive bioassay to study signals between root exudates and arbuscular mycorrhizal fungi*. Biotechnology Techniques. **13**: 893-897.

**Nahas E., Centurion J. F., Assis L. C.** (1994) *Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 18: 49-53.

**Nemec S. & Guy G.** (1982) *Carbohydrate status of mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstocks*. Journal of American Society of Horticultural Sciences, 107: 177-180.

**Niklaus P. A., Alphei J., Ebersberger D., Kampichler C., Kandeler E., Tscherko D.** (2003) *Six years of in situ CO<sub>2</sub> enrichment invoke changes in soil structure and soil biota of nutrient-poor grassland*. Global Change Biology, 9: 585-600.

**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<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants*. Agricultural sciences Proceedings of the National Accademy of Sciences USA, 102: 18830-18835.

**Perotto S., Girlanda M., Martino E.** (2002) *Ericoid mycorrhizal fungi: Some new perspectives on old acquaintances*. Plant Soil, 244: 41-53.

**Porazinska D. L., Bardgett R. D., Blaauw M. B., Hunt H. W., Parsons A. N., Seastedt T. R., Wall D. H.** (2003) *Relationships at the aboveground-belowground interface: Plants, Soil Biota and Soil Processes*. Ecological Monographs, 73: 377–395.

**Ramos A. C., Martins M. A., Façanha A. R.** (2005) *Atividade atpásica e pirofosfática em microsomas de raízes de milho colonizadas por fungos micorrizicos arbusculares*. Revista Brasileira do Solo. 29 (1): 207-213.

**Ramos A. C., Façanha A. R., Feijó J. A.** (2008a) *Ion dynamics during the polarized growth of arbuscular mycorrhizal fungi: from presymbiosis to symbiosis*. In: **Varma A, Hock B.** (eds) *Mycorrhiza*. Springer, Germany, p. 241-261.

**Ramos A. C., Façanha A. R., Feijó J. A.** (2008b) *A proton (H<sup>+</sup>) fluxsignature of the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi*. New Phytology, 178: 177-188.

**Ramos A. C., Lima P.T. D., Pedro N., Kasuya M. C., Feijó J. A.** (2009) *A Ph signaling mechanism involved in the spacial distribution of calcium and anion fluxes in ectomycorrhizal roots.* New Phytologist., 181: 448-462.

**Ramos-Zapata J., Guadarrama P.** (2004) *Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales. Arbuscular mycorrhizal fungi in tropical forest restoration.* Uciencia, 1: 59-65.

**Rapparini F., Baraldi R., Bertazza G., Branzanti B. & Predieri S.** (1994) *Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit trees.* Journal of Horticultural Science, 69: 1101-1109.

**Rasche F., Hödl V., Poll C., Kandeler E., Gerzabek M. H., Elsas J. D., Van, Sessitsch A.** (2006) *Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure.* FEMS Microbiology Ecology, 56: 219-235.

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

**Redecker D., Morton J. B., Brunds T. D.** (2000b) *Ancestral linages of arbuscular mycorrhizal fungi: Molecular Phylogenetics and Evolution.* San Antonio. 14: 276-284.

**Reis V.M., Olivares F.L., Doberreiner J.** (1994) *Improved methodology for isolation and identification of Acetobacter diazotrophicus and confirmation of its endophytic habitat.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, 10: 401-405.

**Remy W., Taylor T. M., Hass H., Kerp H.**(1994) *Four hundred million-year-old vesicular arbuscular - mycorrhizae.* Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 91: 11841-11843.

**Renella G., Landi L., Mina J. M. G., Giagnoni L., Nannipieri P.** (2011) *Microbial and hydrolase activity after release of indolacetic acid and ethylene-polyamine precursors by a model root surface: Applied Soil Ecology,* 47: 106 -110.



**Requena N., Perez-Solis E., Azcon-Aguilar C., Jeffries P., Barea J.M.** (2001) *Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems*: Applied Environmental Microbiology, **67**: 495–498.

**Rillig M. C, Wright S. F., Nichols K. A., Schmidt W. F. & Torn M. S.** (2001) *Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils*. Plant Soil, 233: 167-177.

**Rillig M. C.** (2004) *Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation*. Can.J. Soil Sci. 84: 355-363.

**Robinson D. G., Hoppernath M., Oberbeck K., Luyloc P., Ratajczak R.** (1998) *Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in Chlamydomonas reinhardtii*. Botanica Acta, 111: 108-122.

**Sanders I. R., Clapp J. P., Wiemken A.** (1996) *The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems-A key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis*. New Phisiology, 133: 123-134.

**Schenk P. M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C. & Manners J. M.**(2000) *Coordinated plant defense responses*. IN: Arabidopsis revealed by microarray analysis. PNAS, 97: 11655-11660.

**Schreiner R. P., Pinkerton J. N. & Ring J. N.** (2008) *Nematodes (Mesocriconema xenoplax) alter root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in grape roots*. In: A low P soil. Soil Biology and Biochemistry, 40: 1870-1877.

**Schübler A., Schwarzott D., Walker C.** (2001) *A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution*. Mycol. Res. 105: 1413–1421.

**Silva M. S. F.** (2005) *Bioquímica em Agropecuária*. Ed. Ciência brasiliis, Alfenas, Brasil, p.113-116.

**Silveira A. P. D, Andrade S. A. L., Tristão F. S. M.** (2010) *Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos*

comerciais. *Bragantia: Solo e Nutrição de Plantas. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais*. Instituto Agrônomo, Campinas, SP, **65**(4). 23-25.

**Simon L., Levesque R. C., Lalonde M.** (1993) *Origen and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants*. *Nature*, 363: 67-69.

**Siqueira J. O., Franco A. A.** (1988) *Biologia do solo: fundamentos e perspectivas*. Lavras: Eds. FAEPE, p. 125-166.

**Siqueira J. O., Lambais M. R., Türmer S. L.** (2002) *Fungos micorrízicos arbusculares*. *Biologia, Ciência e desenvolvimento*, nº25 - março/abril.

**Siqueira A. F., Azevedo G. I., Torres-Neto A., Peçanha L. A., Campostrini E., Façanha R. A., Ramos A. C.** (2010) *Efeitos da colonização micorrízica na capacidade fotossintética e crescimento de Tomateiros (Solanum lycopersicum) selvagem e mutantes AVP1OX, super expressando a H<sup>+</sup>-pirofosfatase vacuolar, sob limitação nutricional*. *Anais do Congresso de Biofertilizante, VIII. Reunião Bras. de Microbiologia do Solo*. 109-1572, Guarapari, p.75.

**Slezack S., Dumas-Gaudot E., Paynot M. & Gianinazzi S.** (2000) *Is a fully established arbuscular mycorrhizal symbiosis required for bioprotection of Pisum sativum roots against Aphanomyces euteiches?* *Molec, Plant-Microbe Interact.* 13: 238-241.

**Smith S. E., Read D.** (2008) *Mycorrhizal Symbiosis, third ed.* Academic Press London, p. 787.

**Souza F. A.** (2000) *Banco Ativo de Glomales da Embrapa Agrobiologia: Catalogação e Introdução de novos isolados desde 1995*. (Seropédica: **EMBRAPA** Agrobiologia, 40 p. 123).

**Souza R. G., Maia L. C., Sales M. F., Trufem S. F. B.** (2003) *Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga,*

na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 26 (1): 49-60.

**Sylvia D. M. & Williams S. E.** (1992) *Vesicular–arbuscular mycorrhizae and environment stress*. In: **A.S.A, C.S.S.A, S.S.S.A** (Eds.) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. A. S. A. Special Publication, 54: 101-124.

**Sylvia D. M, Wilson D. O., Graham J. H., Maddox J. J., Millner P., Morton J. B., Skipper H. D., Wright S. F. & Jarstfer, A. G.**(1993) *Evaluation of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils*. *Journal of Biology and Biochemistry*, 25: 705-713.

**Sylvia D. M.** (1992) *Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi* In: **Norris JR, Read DJ, Varma AK.** (Eds) *Methods. In microbiology: techniques for the study of mycorrhiza*. New York Academic Press, p. 53-66.

**Sze H.** (1999) *H<sup>+</sup>- translocating ATPase: advances using membrane vesicles*. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 36: 175-208.

**Sze H., Li X., Palmgren M. G.** (1999) *Energization of Plant Cell Membranes by H<sup>+</sup>-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis*. *The Plant Cell*, 11:677-690.

**Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, De Vries O. M. H., Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F.** (2001) *Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globules* roots*. *New Phytologist*, 149: 127-135.

**Tawaraya K., Hashimoto K., Wagatsuma T.** (1998) *Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita**. *Mycorrhiza*.8: 67-70.

**Thomsom B. D., Robson A. D., Abott L. K.** (1986) *Effects off phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* e *Glomus fasciculatum* in relation to roots carbohydrates*. *New Phytologist*, 103: 751-756.

**Trappe J. M., Schenck N. C.** (1982) *Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonales)* In: **Schenck N. C.** ed. *Methods and Principles of Micorrhizal Research*. St. Paul The American Phytopathological Society. 1-9.

**Varma A.** *Mycorrhizal Manual.*(1998) *Jawaharlal Nehru University School of Life Scienses*. New Delhi, India, Springer lab.

**Vierhrlig H., Alt M., Mohr U., Boller T., Weimken A.** (1994) *Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and b-1,3- glucanase in the roots host and no-host plants of vesicular-arbuscular fungi after inoculation with Glomus mosseae*. *Journal of Plant Physiology*, 143: 337-343.

**Wolters V. I.**(2000) *Invertebrate control of soil organic matter stability*. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 1-19.

**Yang C. H., Crowley D. E.** (2000) *Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status*. *Appl. Environ. Microbiology*, 66: 345-351.