

**FISIOLOGIA E ASPECTOS PÓS-COLHEITA DO TOMATEIRO COM  
SUBEXPRESSÃO DA ENZIMA L-GaLDH EM ASSOCIAÇÃO COM  
A BACTÉRIA *Azospirillum brasiliense***

**ISABELLE FARIA MATOS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
SETEMBRO - 2025**

**FISIOLOGIA E ASPECTOS PÓS-COLHEITA DO TOMATEIRO COM  
SUBEXPRESSÃO DA ENZIMA L-GaLDH EM ASSOCIAÇÃO COM A  
BACTÉRIA *Azospirillum brasiliense***

**ISABELLE FARIA MATOS**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO – 2025

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
UENF - Bibliotecas  
Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M433 Matos, Isabelle Faria.

FISIOLOGIA E ASPECTOS PÓS-COLHEITA DO TOMATEIRO COM SUBEXPRESSÃO DA ENZIMA L-GalLDH EM ASSOCIAÇÃO COM A BACTÉRIA *Azospirillum brasiliense* / Isabelle Faria Matos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

117 f. : il.  
Bibliografia: 93 - 111.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2025.  
Orientador: Jurandi Goncalves de Oliveira.

1. ácido ascórbico. 2. bactérias promotoras do crescimento. 3. respiração. 4. mitocôndria..  
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

# FISIOLOGIA E ASPECTOS PÓS-COLHEITA DO TOMATEIRO COM SUBEXPRESSÃO DA ENZIMA L-GalLDH EM ASSOCIAÇÃO COM A BACTÉRIA *Azospirillum brasiliense*

**ISABELLE FARIA MATOS**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovado em 04 de Setembro de 2025

Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 MARCOS JOSE DE OLIVEIRA FONSECA  
Data: 04/11/2025 10:20:38-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Marcos José de Oliveira Fonseca - EMBRAPA

Documento assinado digitalmente  
 ANTONIO JESUS DORIGHETTO COGO  
Data: 28/10/2025 17:05:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo- UENF

Documento assinado digitalmente  
 FABIO LOPES OLIVARES  
Data: 28/10/2025 21:56:21-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Fábio Lopes Olivares - UENF

Documento assinado digitalmente  
 JURANDI GONCALVES DE OLIVEIRA  
Data: 04/11/2025 10:31:09-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Jurandi Gonçalves Oliveira – UENF  
(Orientador)

*"Dedico este trabalho à minha madrinha, que partiu, mas deixou em mim ensinamentos, carinho e inspiração que nunca se apagarão. Sua memória vive em cada passo da minha caminhada."*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela força, sabedoria e paciência em todos os momentos desafiadores dessa caminhada.

À minha família por todo o suporte, incentivo e amor, nada seria possível sem o apoio incondicional da minha mãe.

Ao meu orientador, agradeço por toda a contribuição e apoio ao longo da minha caminhada. Agradeço também aos meus companheiros de laboratório por toda a ajuda durante esse período.

Meu muito obrigada à UENF, ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e à agência de fomento Faperj, pela utilização das instalações bem como o apoio financeiro necessário à realização desse trabalho.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade, o meu mais sincero, muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>Ácido ascórbico .....</b>	<b>14</b>
<b>Química da molécula do AA nas células vegetais .....</b>	<b>14</b>
<b>Importância do AA para as plantas .....</b>	<b>14</b>
<b>Biossíntese do AA .....</b>	<b>17</b>
<b>Galactona-1,4-lactona desidrogenase - L-GaILDH.....</b>	<b>20</b>
<b>L-GaILDH e a respiração .....</b>	<b>20</b>
<b>Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial - CTEm.....</b>	<b>21</b>
<b>Conexões entre a L-GaILDH e a CTEm .....</b>	<b>22</b>
<b>Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).....</b>	<b>24</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>Materiais biológicos .....</b>	<b>28</b>
<b>Compatibilidade bactéria-fungo .....</b>	<b>29</b>
<b>Inoculação e crescimento do tomateiro .....</b>	<b>29</b>
<b>Avaliações quantitativas e qualitativas de crescimento .....</b>	<b>30</b>
<b>Avaliações ecofisiológicas .....</b>	<b>31</b>
<b>Avaliação do conteúdo de clorofila nas folhas.....</b>	<b>31</b>
<b>Análises de qualidade e vida útil dos frutos .....</b>	<b>32</b>
<b>Medição da respiração em mitocôndrias isoladas do tecido vegetal .....</b>	<b>33</b>
<b>Isolamento das mitocôndrias de raízes e frutos .....</b>	<b>33</b>
<b>Isolamento das mitocôndrias de folhas.....</b>	<b>34</b>
<b>Quantificação das proteínas no extrato mitocondrial .....</b>	<b>35</b>
<b>Quantificação da atividade respiratória.....</b>	<b>35</b>
<b>Determinação do efeito da L-GaILDH na respiração em mitocôndrias isoladas do tecido vegetal .....</b>	<b>36</b>
<b>Quantificação da atividade da enzima L-GaILDH em mitocôndrias isoladas .....</b>	<b>36</b>
<b>Extração de RNA para determinação da expressão gênica de genes de interesse da CTEm e do metabolismo do ácido ascórbico.....</b>	<b>36</b>
<b>Analises Estatísticas .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>

<b>Compatibilidade entre <i>A. brasiliense</i> ABV5 e <i>Trichoderma longibrachiatum</i> T476.....</b>	<b>38</b>
<b>A presença da bactéria melhora o crescimento e o desenvolvimento do tomateiro .....</b>	<b>40</b>
<b><i>A. brasiliense</i> ABV5 altera características pós-colheita de frutos de tomate e a quantidade de ácido ascórbico na polpa dos frutos .....</b>	<b>53</b>
<b>A presença dos micro-organismos promotores do crescimento é capaz de alterar a respiração mitocondrial nos diversos tecidos do tomateiro</b>	<b>59</b>
<b>A bactéria <i>A. brasiliense</i> ABV5 afeta a atividade da L-GaLDH nos diferentes tecidos vegetais em presença de estimulantes e inibidores da AOX.....</b>	<b>66</b>
<b>Genes relacionados à respiração mitocondrial e ao metabolismo do ácido ascórbico são influenciados pela presença de <i>A. brasiliense</i> ABV5 e <i>T. longibrachiatum</i> T476 na planta, bem como a subexpressão da L-GaLDH em plantas de tomate.....</b>	<b>70</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>112</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AA: Ácido ascórbico

Asc: Ascorbato

ABA: Ácido abscísico

ACC: Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano

ACO: 1-Aminociclopropano-1-carboxílico oxidase

ADP: Adenosina difosfato

AOX: Oxidase alternativa

ATP: Adenosina trifosfato

BPCV: Bactérias promotoras do crescimento vegetal

COX: Citocromo c oxidase ou Complexo IV

CTEm: Cadeia transportadora de elétrons mitocondriais

Cyt c: Citocromo c

DHA: Ácido dehidroascórbico

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FADH<sub>2</sub>: Forma reduzida da Flavina adenina dinucleotídeo

Fv/Fm: Eficiência quântica máxima do fotossistema II

GA: Giberelina

L-GaIL: L-Galactono-1,4-lactona

L-GaILDH: L-Galactono-1,4-lactona desidrogenase

L-GuIL: L-Gulono-1,4-lactona

L-GuILDH: L-Gulono desidrogenase

MDHA: Ácido monodehidroascorbato

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo

P.A.: Parte aérea da planta

PHi2: Eficiência quântica efetiva do fotossistema II

PHiNO: Dissipação passiva de energia/ quenting não regulatório

PHiNPQ: Quenching não fotoquímico

PSII: Fotossistema II

qL: Coeficiente de extinção fotoquímica

SPAD: Nível relativo de clorofila

UQ: Ubiquinona

UQH<sub>2</sub>: Uniquinol

VDE: Violaxantina de-epoxidase

## RESUMO

MATOS, Isabelle Faria. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Setembro de 2025. Fisiologia e aspectos pós-colheita do tomateiro com subexpressão da enzima L-GalLDH em associação com a bactéria *Azospirillum brasiliense*. Orientador: Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante essencial ao metabolismo das plantas, formado a partir da L-galactona-1,4-lactona (L-GaLL) por ação da enzima L-GaLL desidrogenase (L-GalLDH). Essa enzima participa na última etapa da biossíntese do AA nas plantas e está localizada no interior das mitocôndrias se relacionando com a estrutura e a ação da cadeia transportadora de elétrons mitocondriais (CTEm). Nos últimos anos, a utilização de bioinoculantes, especialmente bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), tem se destacado como estratégia para aumento da produtividade agrícola. No entanto, embora os efeitos dessas bactérias sobre o crescimento vegetal sejam amplamente investigados, seus impactos sobre a qualidade dos frutos, bem como a respiração mitocondrial permanecem pouco explorados. Considerando a atuação sistêmica das BPCP em toda a planta, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de *Azospirillum brasiliense* em plantas de tomate com subexpressão da enzima L-GalLDH de modo a compreender o papel da bactéria no metabolismo do AA. Foram analisados parâmetros de crescimento, características pós-colheita dos frutos, respiração mitocondrial, atividade da L-GalLDH e expressão relativa de genes associados a CTEm e ao metabolismo de AA. Os resultados demonstraram que os efeitos de *A. brasiliense* foram genótipo dependente. De forma geral, a bactéria promoveu maior crescimento das plantas e influenciou atributos de qualidade dos frutos, como acidez, coloração, perda de massa fresca e teor de AA. Além disso, alterações na respiração mitocondrial e na expressão gênica foram observadas. Com isso, pode concluir que *A. brasiliense* afeta o metabolismo vegetal de maneira abrangente, interferindo na respiração mitocondrial e no metabolismo do ácido ascórbico, com impactos tanto no desenvolvimento das plantas quanto na qualidade pós-colheita dos frutos de tomate.

Palavras-chave: ácido ascórbico, bactérias promotoras do crescimento, mitocôndria, respiração.

## ABSTRACT

MATOS, Isabelle Faria. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro. September, 2025. Physiology and postharvest aspects of tomato with underexpression of the enzyme L-GalLDH in association with the bacterium *Azospirillum brasiliense*. Advisor: Profº Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Ascorbic acid (AA) is an essential antioxidant in plant metabolism, synthesized from L-galactono-1,4-lactone (L-GaLL) through the action of the enzyme L-GaLL dehydrogenase (L-GaLLDH). This enzyme, located in the mitochondria, catalyzes the final step of AA biosynthesis in plants and is related to the structure and function of the mitochondrial electron transport chain (mETC). In recent years, the use of bioinoculants, especially plant growth-promoting bacteria (PGPB), has emerged as a promising strategy to enhance agricultural productivity. However, while the effects of these bacteria on plant growth have been widely investigated, their impact on fruit quality as well as on mitochondrial respiration remains poorly understood. Considering the systemic action of PGPB throughout the plant, this study aimed to evaluate the influence of *Azospirillum brasiliense* on tomato plants with L-GaLLDH downregulation, in order to better understand the role of this bacterium in AA metabolism. Growth parameters, postharvest fruit traits, mitochondrial respiration, L-GaLLDH activity, and relative expression of genes associated with the mETC and AA metabolism were analyzed. The results showed that the effects of *A. brasiliense* are genotype-dependent. In general, the bacterium enhanced plant growth and influenced fruit quality attributes, such as acidity, color, fresh weight loss, and AA content. In addition, changes in mitochondrial respiration and gene expression were observed. In conclusion, *A. brasiliense* exerts a broad influence on plant metabolism by modulating mitochondrial respiration and ascorbic acid metabolism, ultimately impacting both plant development and the postharvest quality of tomato fruits.

Keywords: ascorbic acid, growth-promoting bacteria, mitochondria, respiration.

## INTRODUÇÃO

Conhecido principalmente como uma molécula de alto potencial antioxidante nos vegetais, o L-ácido ascórbico (AA), ou também chamado vitamina C, é essencial ao metabolismo das plantas. Agindo desde a germinação ao amadurecimento de frutos, o AA está envolvido em todas as etapas do desenvolvimento vegetal, possuindo múltiplos papéis e ações diretas ou indiretas na planta (Johson et al., 2024; Paciolla et al., 2019). Sendo co-fator de enzimas, atuando como doador de elétrons ou envolvido na síntese de fitormônios, há diversos processos fundamentais no metabolismo vegetal que têm a participação do AA (Bilska et al., 2019; Njus et al., 2020).

Ainda como uma molécula indispensável, o AA também é necessário ao metabolismo humano, que ao contrário das plantas, não é capaz de sintetizar AA (Gordon et al., 2020). Desse modo, para suprir a necessidade de vitamina C, os humanos devem consumir alimentos ricos em AA como frutas e vegetais (Smirnoff, 2018). Devido a sua importância e variado papel no metabolismo, muitas pesquisas investigam as relações do AA com o metabolismo vegetal, bem como tratamentos capazes de aumentar os níveis de AA em plantas e frutos (Fenech et al., 2019; Lisko et al., 2014).

A enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (L-GalLDH) é responsável pela redução da molécula L-galactona-1,4-lactona (L-GalL) em AA (Bartoli et al., 2000). Sua ação faz parte da etapa final da biossíntese do AA e ocorre no interior das mitocôndrias. Localizada acoplada próximo ao complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTEm), a L-GalLDH se relaciona com a cadeia estruturalmente e através da sua atividade (Bartoli et al., 2016; Matos et al., 2022).

A CTEm é encarregada do processo final da respiração, oxidando as moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> no processo de fosforilação oxidativa para a criação do gradiente eletroquímico de prótons a ser usado para a produção de ATP (Millar et al., 2011). Composta por 4 complexos, 2 vias alternativas, um conjunto de moléculas e proteína, alguns dos seus componentes são afetados e afetam a atividade da L-GalLDH de modo que é possível considerar que a biossíntese do AA se relaciona com a respiração mitocondrial (Leferink et al., 2008).

Com a premissa de melhorar a qualidade nutricional, bem como de aumentar a produtividade de alimentos, a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) ganha cada vez mais força no campo da agricultura sustentável (Reddy, 2014; Sayyed et al., 2019). As BPCV são utilizadas na produção de bioinoculantes para emprego na agricultura visando melhorar a nutrição das plantas, favorecendo seu crescimento e desenvolvimento, com a possibilidade de reduzir a necessidade de utilização de fertilizantes nitrogenados (Kumar et al., 2022; Pozo et al., 2021).

Contudo, a utilização de BPCV na agricultura tem focado na produtividade das plantas, bem como na redução da utilização de fertilizantes industrializados e pouco se sabe a respeito da sua ação ou influência na qualidade dos frutos. Apesar das BPCV entrarem em contato com a raiz das plantas, sua ação no metabolismo é sistemática, afetando diversos aspectos fisiológicos como a fotossíntese, respiração e produção de hormônios (Adeleke et al., 2021). Portanto, espera-se que a bactéria influencie também a produção e formação dos frutos, o que levanta a hipótese que os frutos produzidos por plantas inoculadas com BPCV também possam apresentar alguma alteração em seu metabolismo.

Assim sendo, esse trabalho tem como objetivo geral compreender o papel que o *Azospirillum brasiliense* tem no metabolismo vegetal, bem como a qualidade e vida útil de frutos de tomate. Será investigado se a bactéria é capaz de influenciar no metabolismo do AA em relação à enzima L-GalLDH através do uso de plantas mutantes que a subexpressam. Além disso, o trabalho também afere como o *A. brasiliense* interfere na respiração mitocondrial na etapa de fosforilação oxidativa.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Ácido ascórbico

O AA também chamado de vitamina C foi primeiramente isolado em 1932, sendo conhecido pela sua importância no combate ao escorbuto, doença comum entre marinheiros e viajantes no passado, que devido à sua má alimentação durante longas viagens marítimas eram acometidos dessa doença (Svirbely e Szent-Györgyi, 1932).

Para suprir a necessidade humana da vitamina C se faz necessário o consumo de frutas, legumes e outros vegetais ricos neste componente químico, tendo em contados que seres humanos que sintetizam o AA (Smirnoff, 2018).

### Química da molécula do AA nas células vegetais

O AA é nomeado quimicamente como 2-oxi-L-treohexônio-1,4-lactona-2,3-enedio, ou L-treo-hex-2-enono-1,4-lactona, sendo uma molécula orgânica composta de 6 carbonos e representado pela fórmula  $C_6H_8O_6$ . O mesmo se faz presente no grupo das lactonas, que geralmente são originadas a partir dos ácidos carboxílicos que ao perder uma molécula de  $H_2O$  transformam em ésteres de cadeia fechada. Porém, ao contrário de outras lactonas, o ácido ascórbico é derivado de açúcares (Roth e Streller, 2009). O mesmo é ainda solúvel em água, insolúvel em solventes orgânicos e pouco solúvel em etanol e acetona, sendo facilmente oxidado em solução.

Nas plantas o AA pode ser encontrado em diferentes formas, sendo elas: a forma ionizada, como ascorbato (Asc), a forma totalmente oxidada, como ácido dehidroascórbico (DHA), ou na parcialmente oxidada, chamado de ácido monodehidroascórbico (MDHA), forma essa bastante instável e de vida curta. Sendo assim, para quantificar o conteúdo de AA no tecido vegetal é necessário considerar as duas principais formas que o mesmo se apresenta, o AA e o DHA. Ambas as formas prevalecem em relação às outras e apresentam os maiores níveis de atividade antioxidante.

### Importância do AA para as plantas

Conhecido principalmente devido à sua atuação como antioxidante, o AA possui a capacidade de doar elétrons e reduzir os níveis de espécies reativas de

oxigênio (ERO), moléculas danosas ao metabolismo celular (Njus et al., 2020). Desse modo, o AA é capaz de proteger as membranas e diminuir a peroxidação lipídica de modo rápido e eficiente antes mesmo da ação de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase (Paciolla et al., 2019). De forma aplicada, o AA tem o papel de proteger as plantas devido à sua capacidade antioxidante (Akram et al., 2017).

Com sua habilidade de doação de elétrons, o AA também é capaz de influenciar na atividade fotossintética. Sob condições de estresse que leve à inibição do fotossistema II (PSII), o AA pode agir doando elétrons diretamente para a cadeia transportadora de elétrons fotossintética, preservando seu funcionamento e a produção de ATP (Ivanov, 2014). Ainda sobre a fotossíntese, o AA atua no “ciclo da violaxantina-zeaxantina”, sendo um cofator enzimático da enzima violaxantina-de-epoxidase (VDE), que tem por função converter violaxantina em zeaxantina (Awad et al., 2015). Desse modo, a zeaxantina, que é um pigmento acessório com maior eficiência na dissipação do excesso de energia luminosa, atua evitando a fotoinibição causada pelo estresse luminoso (Saga et al., 2010).

Entre outras enzimas importantes em que o AA atua como cofator está a classe das enzimas deoxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. Esse grupo de enzimas catalisa a incorporação de oxigênio em substratos orgânicos. Essas enzimas estão distribuídas em todo o metabolismo vegetal, sendo presente desde o catabolismo de auxinas, à síntese de giberelina (GA) e de ácido abscísico (ABA) (Arrigoni e De Tullio, 2002; Smirnoff, 2018). Além disso, o AA também é um cofator da enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACO), que faz parte da via de síntese do etileno na última etapa da formação desse hormônio (Murphy et al., 2014; Ververidise John, 1991). Considerando o seu papel como cofator, o AA atua na síntese e catabolismo de hormônios e também no processo de amadurecimento de frutos e da senescência foliar.

O AA se apresenta no mecanismo de defesa das plantas contra ataques de patógenos e espécies herbívoras devido ao seu papel na síntese de compostos como glicosinolato, antocianinas, etileno e ácido jasmônico (Akram et al., 2017; Borestein, 2017). Além disso, o AA é fundamental no ciclo celular, participando do processo de multiplicação, alongamento e diferenciação das células, bem como no processo de morte celular programada, protegendo a célula de estresse que

levaria à morte celular (Pinto et al., 1999; Pinto e De Gara, 2004; Stasolla e Yeung, 2001, 2007; Valandro et al., 2020).

Nos processos de desenvolvimento da planta, o AA também se faz presente em quase todas as etapas iniciais. Na embriogênese da semente, o mesmo atua como regulador da polaridade e progressão da divisão celular (Chen e Gallie, 2012; Stasolla et al., 2008). Na germinação das sementes, o AA é responsável pela manutenção do balanço oxidativo a partir do controle da produção de ERO, o que permite que a germinação ocorra durante o processo de embebição das sementes (Chen et al., 2014). Ainda, na germinação o AA tem participação importante no controle dos níveis de ABA e GA, devido à sua participação na síntese desses hormônios (Ye et al., 2012).

Considerando a relação ABA/GA, o AA influencia no processo de florescimento (Barth et al., 2006; Weng et al., 2016). O AA também é conhecido por influenciar na expressão do gene *LEAFY* que atua durante a floração. Foi verificado que ao pulverizar uma solução com L-GaLL em plantas de *Arabidopsis* transgênicas, que expressam o gene da glucoronidase sobre o controle do promotor do gene *LEAFY*, as plantas apresentaram atraso na floração (Attolico e De Tullio, 2006). Os autores observaram que as plantas ao receberem L-GaLL apresentaram uma maior concentração de AA, de modo que no estágio de oito rosetas o conteúdo de AA era duas vezes maior que no controle. Essa maior concentração gera um atraso no período de florescimento, apesar, das plantas apresentarem inflorescências com alturas semelhantes no final da floração quando comparadas ao controle. Quando analisado nas plantas transgênicas, os autores constataram que o tratamento com L-GaLL induz uma menor expressão do gene *LEAFY* que está ligado ao processo de floração. Esse gene ainda necessita de um nível ideal de GA para induzir o florescimento, assim os autores indicam que o AA pode influenciar tal gene de modo indireto através do seu papel na síntese de GA.

Nas raízes, o AA se relaciona com o processo de crescimento e arquitetura radicular, na aquisição de nutrientes metálicos e em certas situações na inibição do surgimento de raízes laterais (González-Reyes et al., 1994; Hidalgo et al., 1989; Olmos et al., 2006; Tyburski et al., 2012).

Com isso, é possível perceber que o AA influencia a vida da planta, atuando desde a formação de células vegetais até o processo de senescência e

amadurecimento de frutos. Devido a essa importância, os organismos vegetais possuem um metabolismo de AA considerado dinâmico apresentando diferentes níveis de produção e concentração de AA em diferentes fases de vida da planta (Hossain et al., 2017).

### Biossíntese do AA

O AA tem múltiplas funções, sendo fundamental para os organismos vegetais, que são capazes de sintetizá-lo. Atualmente são conhecidas quatro rotas distintas de biossíntese do AA, as quais se relacionam entre si (Figura 1). Dentre essas rotas, a denominada “via Smirnoff-Wheeler” é a que está completamente elucidada com todas as reações definidas e conhecidas. As demais, a “via do L-gulose”, a “via do D-galacturonato” e a “via do mio-inositol” ainda contam com etapas a serem confirmadas e enzimas a serem caracterizadas (Smirnoff et al., 2001; Szarka et al., 2013).

Apesar de se apresentarem em quatro vias diferentes, as vias de biossíntese do AA culminam em dois possíveis precursores, sendo eles, a L-GalL e o L-gulono-1,4-lactona (L-GulL). Esses precursores então são utilizados por duas enzimas diferentes para formar o AA, respectivamente, a L-GalLDH e a L-GulL desidrogenase (L-GulLDH). Porém, a L-GalLDH é capaz de utilizar ambos os precursores para a formação de AA, apesar de possuir maior afinidade com o L-GalL (Leferink et al., 2008).

A rota principal proposta em 1998 é conhecida como rota “Smirnoff-Wheeler” ou rota D-manose/L-galactose, que utiliza a glicose para a formação do AA. Essa via acontece em dois lugares dentro da célula, começando no citosol e terminando com a transformação do precursor L-GalL em AA no interior das mitocôndrias pela enzima L-GalLDH (Wheeler et al., 1998). Alternativamente a essa via, a rota “L-gulose” culmina na formação do precursor L-GulL, mas ainda há etapas dessa via que precisam ser confirmadas, como, por exemplo, a enzima de síntese do L-gulose a partir do GDP-L-gulose (Jain e Nessler, 2000; Leferink et al., 2008; Szarka et al., 2013).

Importante no processo de amadurecimento dos frutos quando há a degradação das pectinas da parede celular, a “via do D-galacturonato” também é uma via de síntese do AA que apresenta diversas enzimas ainda não totalmente conhecidas. Porém, se sabe que essa via também culmina na formação do precursor L-GalL, que com a ação da L-GalLDH dentro das mitocôndrias é oxidado

a AA (Agius et al., 2003; Li et al., 2010; Loewls e Kelly, 1961). Por fim, a última rota de biossíntese do AA foi hipotetizada considerando o processo de síntese do composto nos animais (Lorence et al., 2004). A “via do mio-inositol” utiliza da conversão de D-glicose-6-fosfato em L-mio-inositol para iniciar o processo de síntese de AA até a formação do precursor imediato do AA, o L-GuIL.

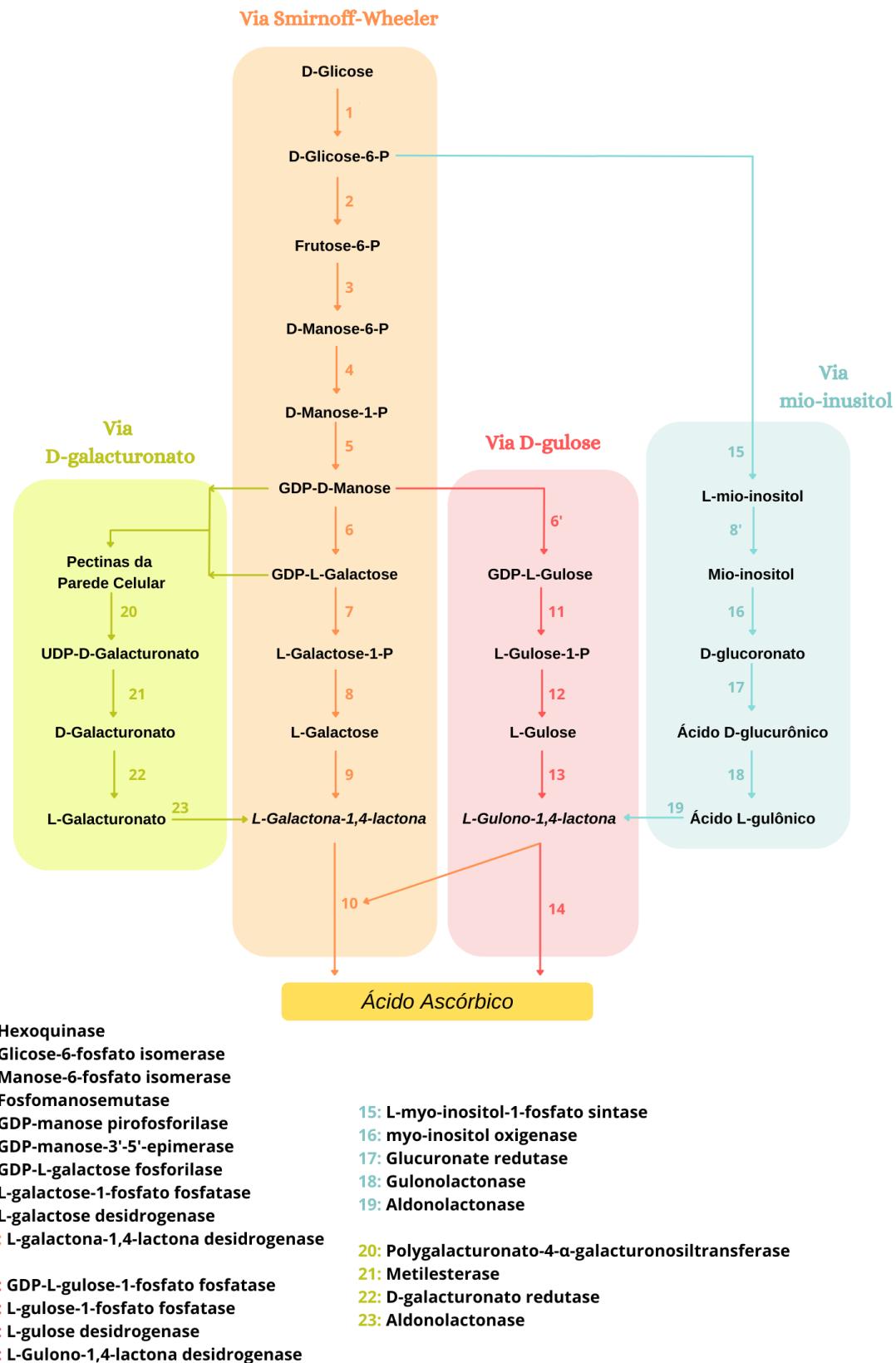


Figura 1: Rotas de biossíntese do AA. Os números representam as enzimas que catalisam as reações dentro de cada via simbolizada em área retangular de diferente cor. A relação numérica com o nome das enzimas segue a coloração relativa a cada via onde a enzima participa da via biossintética (Matos et al., 2022).

### **L-Galactona-1,4-lactona desidrogenase - L-GaLDH**

A enzima L-GaLDH (EC 1.3.2.3) catalisa a etapa final da biossíntese de AA, oxidando o precursor L-GaLL em AA, com a transferência de elétrons para o citocromo C. A etapa da síntese de AA ocorre dentro da mitocôndria, uma vez que a L-GaLDH está associada física e funcionalmente a CTEm. A L-GaLDH é uma flavoenzima classificada como aldonolactona oxirredutase e por ser uma desidrogenase, a mesma necessita de um acceptor final de elétrons alternativo ao oxigênio (Leferink e Van Berk, 2014).

A enzima é expressa por um único gene, tem estrutura monomérica com 598 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 57 kDa e composta de três regiões transmembranares que permitem seu acoplamento à membrana interna da mitocôndria (Rodríguez-Ruiz et al., 2017). Ela utiliza o precursor L-GaLL para a formação de AA, porém, ela também pode usar o L-GuLL como substrato, sendo essa reação menos comum, devido à maior afinidade da enzima para o L-GaLL (Leferink et al., 2008). A atividade da enzima também é multifatorial com influência do tipo de tecido vegetal a qual ela se apresenta, bem como o estágio de desenvolvimento do órgão vegetal e dos níveis de luminosidade em que a planta está exposta (Bartoli et al., 2016; Pateraki et al., 2004).

Apesar de participar da formação do AA, nem sempre uma maior atividade da L-GaLDH corresponde a maiores níveis de AA no tecido vegetal. Tal fato se torna evidente ao se verificar o trabalho de Alhagdowet et al. (2007) que verificaram, em tomate, que o silenciamento do gene da L-GaLDH utilizado nesse trabalho não resultou em redução significativa nos níveis de AA, apesar da baixa expressão da enzima. Outros trabalhos correlacionam uma superexpressão da L-GaLDH com maior conteúdo de AA (Landi et al., 2015; Imai et al., 2009; Tokunaga et al., 2005; Yu et al., 2015; 2017).

### **L-GaLDH e a respiração**

Bartoli et al. (2000) descreveram a L-GaLDH como uma proteína integral inserida na membrana interna da mitocôndria. Estudos posteriores determinaram que a L-GaLDH estava associada com o complexo I da CTEm, participando da montagem desse complexo (Bartoli et al., 2016; Schimmeyer et al., 2016). A seguir, Rodríguez-Ruiz et al. (2017) demonstraram que a L-GaLDH está ligada à membrana interna da mitocôndria através de um domínio transmembranar de 20

aminoácidos, com a porção catalítica da enzima voltada para a periferia da membrana, na face do espaço intermembranar. A partir dessa localização, os autores propuseram que a L-GalLDH é capaz de interagir com as oxidases terminais presentes na CTEm. Considerando tais fatores, reforça a condição que a atividade L-GalLDH se relaciona com a respiração dentro das mitocôndrias.

### **Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial - CTEm**

A CTEm é responsável pela etapa final do processo respiratório, realizando a reoxidação de moléculas com alto potencial redox (NADH e FADH<sub>2</sub>), onde os elétrons provenientes dessas moléculas são transferidos para o O<sub>2</sub>. Paralelamente ao transporte de elétrons na CTEm ocorre o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, o que gera um gradiente eletroquímico através da membrana. Esse gradiente será, então, utilizado pela enzima ATP sintase para produzir ATP, a partir da fosforilação do ADP, acoplando, assim, a fosforilação oxidativa à atividade da CTEm.

A cadeia é formada por 4 complexos principais, sendo eles: NADH-ubiquinona oxirredutase (complexo I), succinato-ubiquinona oxirredutase (complexo II), ubiquinol-citocromo c oxirredutase (complexo III) e o citocromo c oxidase (complexo IV ou COX). Esses complexos são capazes de interagir através da ubiquinona (UQ), uma molécula lipofílica que está inserida na membrana interna da mitocôndria. A interação também ocorre através de uma proteína periférica denominada citocromo c. Inserida na membrana interna de mitocôndrias de plantas se encontra também a oxidase alternativa (AOX) e as NAD(P)H desidrogenases interna e externa que utilizam e alimentam, respectivamente, elétrons para CTEm. Acoplada a CTEm está o complexo V, denominado de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintase, que não possui um papel no transporte de elétrons, mas utiliza do gradiente eletroquímico de H<sup>+</sup> gerado na CTEm para sintetizar ATP (Braun, 2020; Taiz et al., 2017).

A transferência de elétrons na CTEm inicia-se com a ação do complexo I que realiza a oxidação de NADH em NAD<sup>+</sup>, os elétrons frutos dessa reação são encaminhados a UQ ao mesmo tempo que o complexo I bombeia prótons ao espaço intermembranar. Alternativamente, o NADH pode ser oxidado pelas NAD(P)H desidrogenases alternativas presentes na membrana interna das mitocôndrias vegetais. Neste caso, o NAD(P)H é oxidado transferindo os elétrons para a UQ, sem o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar. A UQ

recebe também os elétrons provenientes da oxidação de FADH<sub>2</sub> pelo complexo II, que ao mesmo tempo transforma succinato em fumarato, substratos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Em estado reduzido, a UQ é convertida em ubiquinol (UQH<sub>2</sub>).

Os elétrons que se encontram no UQH<sub>2</sub> podem seguir caminhos distintos. Esses podem ser encaminhados ao complexo III, ou alternativamente a AOX. Caso sejam encaminhados a AOX, esses elétrons são doados ao O<sub>2</sub>, o qual será reduzido a H<sub>2</sub>O. Os elétrons transferidos ao complexo III serão enviados, via citocromo c, para o complexo IV, onde ao final, também serão usados para a redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Diferentemente do que ocorre na passagem dos elétrons pela AOX, quando os complexos III e IV transportam elétrons, paralelamente, também há o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar. Portanto, a passagem dos elétrons pela via alternativa, AOX, reduz o potencial de geração de ATP da respiração.

### **Conexões entre a L-GalLDH e a CTEm**

A L-GalLDH está associada com a CTEm de duas maneiras diferentes, através da sua estrutura e de sua atividade. Essa conectividade entre a L-GalLDH e a CTEm ocorre através do complexo I e do citocromo c (Braun, 2020).

A L-GalLDH se conecta estruturalmente a CTEm através do complexo I. Porém, a enzima não é inibida pela rotenona, conhecido inibidor do complexo I (Millar et al., 2003). Foi comprovado, porém, que a L-GalLDH é fundamental para a montagem e formação do complexo I, de modo que frações da L-GalLDH são encontradas no complexo I ativo apesar de não estarem funcionalmente conectados (Pineau et al., 2008; Schertl et al., 2012). Segundo Schertl et al. (2012), a L-GalLDH é fundamental durante o processo de montagem do complexo I para estabilizar o processo de formação da estrutura do mesmo.

A relação funcional da L-GalLDH e a CTEm se dá devido à sua classificação como uma desidrogenase. Desse modo, a L-GalLDH necessita de um receptor de elétrons diferente do O<sub>2</sub> e utiliza para isso o citocromo c durante a oxidação do L-GalL a AA (Bartoli et al., 2000). Sendo assim, é possível inferir que a enzima pode influenciar diretamente a atividade respiratória através da CTEm tendo um fluxo de transferência de elétrons dependente da L-GalLDH.

A respiração via L-GalLDH é dependente de L-GalL, precursor do AA, e apresenta um consumo de oxigênio e capacidade de síntese de ATP menor se

comparado a outros substratos como malato, NADH ou succinato, devido à entrada de elétrons na CTEm ocorrer via citocromo c e complexo IV, como demonstrado na Figura 2 (Leferink et al., 2008). Com a atividade da L-GalLDH na cadeia haverá a entrada de dois elétrons frutos da oxidação do L-GalL que seguirão para o citocromo c. Posteriormente, o citocromo c entregará esses elétrons para o complexo IV, que reduzirá o O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O enquanto bombeia prótons ao espaço intermembranar, contribuindo em parte para a formação do gradiente eletroquímico de prótons.

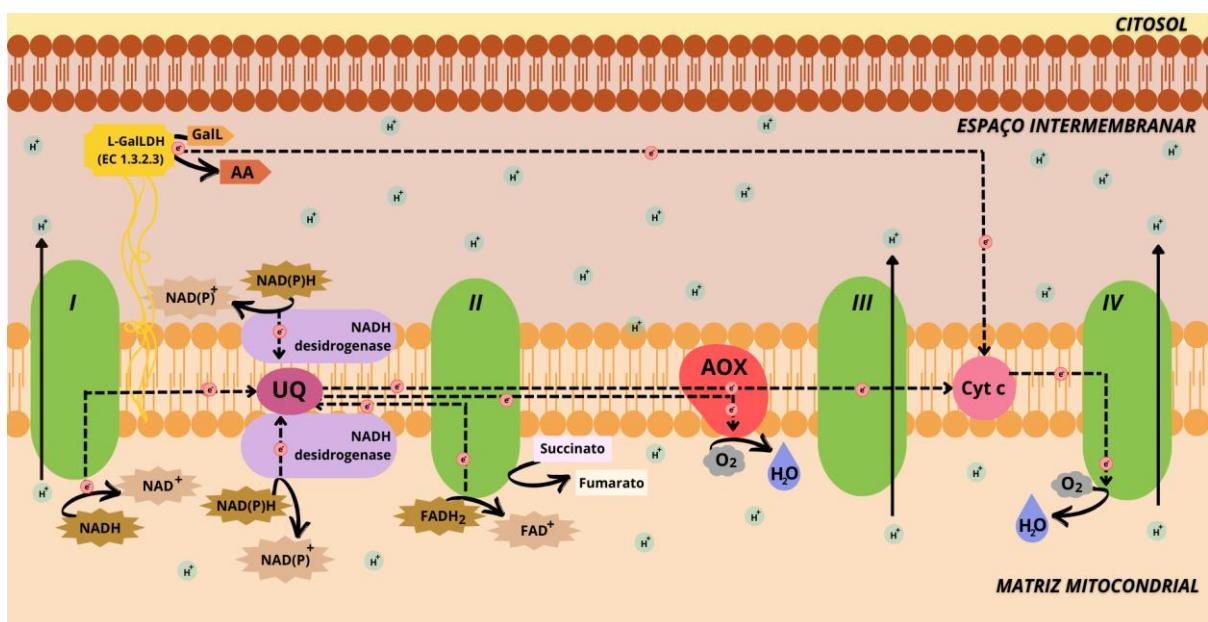


Figura 2: Esquema ilustrativo do transporte de elétrons e prótons na CTEm e o papel da L-GalLDH. As setas pretas pontilhadas indicam os caminhos do transporte de elétrons dentro da cadeia, e setas pretas retas representam o bombeamento de prótons que ocorre da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial. As setas pretas arredondadas representam os substratos e produtos da oxirredução feita pelo complexo em questão. A enzima L-GalLDH é indicada na cor amarela e em verde estão os complexos da CTEm indicados pelos números romanos correspondendo aos complexos I-IV. O pool de ubiquinona se encontra em magenta, enquanto que a AOX está representada em vermelha. A proteína citocromo c se encontra em rosa. Com as NADH desidrogenases da cadeia se encontrando na cor lilás. Gall: precursors do ácido ascórbico. AA: ácido ascórbico em laranja. As moléculas de poder redutor (NADH e FADH<sub>2</sub>) estão representadas em marrom. Os círculos azuis representam os prótons e os círculos vermelhos os elétrons (Matos et al., 2022).

Por utilizar o citocromo c como acceptor final de elétrons, a atividade da L-GalLDH, depende da disponibilidade que o citocromo tem de receber os elétrons provenientes do L-GalL. Considerando o fluxo de elétrons na CTEm até o complexo IV, a atividade da L-GalLDH pode ser influenciada pela atividade da cadeia, assim como pode influenciar na CTEm, tendo em vista que para que o citocromo c esteja em seu estado oxidado e prontamente disponível para interagir com a L-GalLDH, ele não pode estar reduzido pelo complexo III.

Em relação aos outros componentes da CTEm, a L-GalLDH é capaz de ter sua atividade estimulada quando há a inibição dos complexos I e II e a enzima é inibida quando a AOX está inativa em frutos (Santana, 2019). Isso ocorre porque com a inibição dos complexos existe uma maior disponibilidade do citocromo c receber os elétrons provenientes da L-GalLDH. Por outro lado, quando a AOX está inativa isso significa que a mesma não poderá receber os elétrons do UQH<sub>2</sub>, de modo que esses elétrons só poderão ser entregues para o complexo III que reduzirá o citocromo c tornando-o, assim, indisponível para receber os elétrons da atividade L-GalLDH. No mesmo sentido, ao estimular a AOX, a atividade da L-GalLDH aumentou significativamente em mitocôndrias isoladas de tomate (Santana, 2019). Portanto, há fortes evidências que a L-GalLDH interfere na CTEm, de modo que a biossíntese de AA é capaz de influenciar na respiração além dos diversos outros papéis que a molécula apresenta no metabolismo vegetal.

### **Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)**

As BPCV são microrganismos capazes de se relacionar positivamente com o vegetal em uma relação benéfica entre a planta e o microrganismo (Kloepper e Schoth, 1980). Geralmente isoladas nas superfícies de raízes ou da rizosfera, as BPCV podem se relacionar com o organismo vegetal através de mecanismos de simbiose, de associação ou endofiticamente acarretando em benefícios para o hospedeiro (Sayyed et al., 2019).

A ação das BPCV nas plantas conta com mecanismos diretos ou indiretos que promovem o crescimento e a proteção do organismo vegetal (Wani e Gopalakrishnan, 2019). As bactérias são capazes de aumentar a produção de fitormônios, fixar nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>), solubilizar fosfato e produzir sideróforos para a aquisição de ferro (Ferreira et al., 2019; Roriz et al., 2020; Tsukanova et al., 2017). As BPCV atuam, dessa forma, diretamente no metabolismo vegetal ajudando no desenvolvimento e crescimento das plantas (Glick, 2012). As ações das BPCV, contudo, também podem ser indiretas ao minimizar a ação de estresses bióticos e abióticos em seus hospedeiros (Dey et al., 2014). As BPCV produzem moléculas de baixo peso molecular que atuam no metabolismo vegetal, tal como metabólitos secundários, enzimas de degradação da parede celular, cetonas, aldeídos, álcoois, entre outros. Indiretamente, as

BPCV também ajudam as plantas a assimilar nutrientes e proteger contra patógenos.

Para se obter uma BPCV ideal não basta que a bactéria ajude no crescimento e desenvolvimento das plantas. A mesma deve possuir uma alta competência para agir na rizosfera, ter capacidade de competir contra organismos saprofíticos, aumentar sua massa, tolerar a dessecação, bem como o calor e agentes oxidantes. Ademais, as BPCV também devem contar com um amplo espectro de ação, compatibilidade com outras rizobactérias, possuir mecanismos confiáveis para o controle de pragas e acima de tudo ser seguras ao ecossistema (Jeyarajan e Nakkeeran, 2000; Reddy, 2014).

### **Gênero *Azospirillum***

Composta por espécies procariontes capazes de regular diversas ações no metabolismo da planta, o gênero *Azospirillum* é um dos gêneros mais estudados. Os mesmos são capazes de colonizar milhares de espécies de plantas, influenciando no desenvolvimento e crescimento das plantas e promovendo aumento de produtividade no campo (Bashan e De-Bashan, 2010; Tienet al., 1979).

Identificado pela primeira vez na década de 70, o gênero *Azospirillum* é composto por rizobactérias pertencentes à subclasse das α-proteobactérias. Essas bactérias são gram-negativas, com formato em bastonete, possuem flagelo e são de vida livre com ampla distribuição geográfica nas regiões tropicais e subtropicais (Hall e Krieg, 1984; Tarrand et al., 1978). As espécies do gênero *Azospirillum* podem ser classificadas como bactérias endofíticas facultativas (Dobbelaere et al., 2002; Döbereiner, 1992). Quando em vida livre, os micro-organismos se estabelecem em complexos comunitários ligados a uma matriz polimérica composta de diversas estruturas e moléculas que atuam como um biofilme (Pedraza et al., 2020). Em associação, as bactérias são capazes de colonizar as raízes de plantas se encontrando externamente no mucigel das raízes que é formado com a liberação dos exsudados radiculares, ou internamente na zona de elongação e de pelos radiculares dentro dos espaços intercelulares das raízes (Pedraza et al., 2020). Nesse caso, as espécies de *Azospirillum* utilizam-se de partes distruptas de tecidos corticais nas junções das raízes laterais para acessar o interior da planta sem causar dano ao tecido vegetal (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000).

No metabolismo vegetal, as bactérias são capazes de melhorar a produção de hormônios que atuam no crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como auxina, citocininas, ácido abscísico e giberelinas (Cassán et al., 2014; Esquivel-Cote et al., 2010; Lira et al., 2020; Masciarelli et al., 2013; Xu et al., 2018). Elas também são capazes de reduzir os níveis de etileno que são responsáveis por causar senescência foliar (Iqbal et al., 2017). As mesmas também se relacionam com o metabolismo do nitrogênio sendo capazes de fixar N<sub>2</sub> (Repke et al., 2013). *Azospirillum spp.* é capaz de solubilizar fosfato para as plantas, atuar como biocontrole de patógenos vegetais e ainda ajudar a planta a resistir a estresses abióticos (Bashan e De-Bashan, 2010; Creus et al., 1998; Puente et al., 2004). No metabolismo antioxidante, foi relatado que o gênero *Azospirillum* é capaz de desencadear a produção e ação de enzimas antioxidantes, tais como ascorbato peroxidase, superóxido dismutase e catalase (Fukami et al., 2018; Xu et al., 2018). Desse modo, as bactérias são capazes de ajudar na regulação das ERO, reduzindo o estresse oxidativo no vegetal (Fukami et al., 2017; 2018; Heidari e Golpayegani, 2012; Upadhyay et al., 2012). Além disso, a bactéria também influencia no metabolismo fotossintético, sendo capaz de aumentar a concentrações de pigmentos como a clorofila, proteger o fotossistema em condições de estresse abiótico e até mesmo aumentar a densidade estomática (Basham et al., 2006; Lade et al., 2018; Larraburu et al., 2016; Moretti et al., 2021). Contudo, fica evidente nesses mesmos trabalhos que o efeito de bactérias do gênero *Azospirillum* na planta pode variar a depender da condição do ambiente, do tipo de planta e do tipo de cultivar.

Com 22 espécies descritas no gênero *Azospirillum*, as espécies *A. brasiliense* e *A. lipoferum* são as mais estudadas em relação à sua fisiologia, genética e bioquímica. As mesmas ainda não apresentam uma alta especificidade ao interagir com a planta hospedeira, podendo então se encontrar ligadas a diversas espécies vegetais diferentes (Pereg et al., 2016). Por isso, essas espécies são as mais utilizadas para a formulação de bioinoculantes, tendo por função ajudar no crescimento e produtividade das lavouras, assim como na redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados industrializados (Cassán e Diaz-Zorita, 2016; Fibach-Paldi et al., 2012). Essas espécies também são capazes de atuar como indutor de tolerância ao estresse hídrico ou salino, como um agente biorremediador e biofortificante e também atuando como em

mecanismos de biocontrole (Pedraza et al., 2020). Com inúmeros mecanismos de interação planta-hospedeiro, o gênero *Azospirillum* ganha cada vez mais interesse e aplicabilidade na agricultura sustentável.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Materiais biológicos

A pesquisa foi realizada em plantas de tomate cereja do tipo selvagem (WT) e em uma linha transgênica com o gene da enzima L-GalLDH silenciado (*P35S:Slgalldh<sup>NAi</sup>* linha 8-14). As sementes de tomate-cereja (*Solanum lycopersicum* 'West Virginia 106') foram cedidas pelo pesquisador Pierre Baldet do *Institut National de la Recherche Agronomique*, Université Bordeaux, França.

A linha transgênica 8-14 foi transformada através da inserção de um fragmento de RNA de interferência específico para SIGalLDH sob controle do promotor 35S do vírus mosaico de couve-flor (CaMV) (Alhagdow et al., 2007). Essa linha apresenta uma alteração na atividade da enzima e da respiração via L-GalLDH mais explícita e consistente entre todas as transformações realizadas por Alhagdow et al. (2007) e, por isso, foi escolhida para o estudo.

Para o organismo simbionte foi utilizada a bactéria endofítica promotora de crescimento *A. brasiliense* devido à sua capacidade de colonizar apenas a raiz da planta. O inóculo utilizado, cepa ABV5, foi obtido da coleção de culturas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro (UENF) através do professor Dr. Fábio Lopes Olivares. Considerando que a cepa específica utilizada no nosso trabalho está ligada a espécies vegetais tal como soja, milho e trigo, foi decidido utilizar o fungo *Trichoderma longibrachiatum* T476 para melhorar a inoculação da bactéria no tomateiro em um tratamento de coinoculação.

### Manutenção dos micro-organismos

A bactéria foi mantida ativa com passagem para nova placa com meio DYGS a cada 15 dias. O fungo foi repicado a cada necessidade de uso. Uma amostra pura foi mantida com esporos em água. Um saco com 200 g de arroz e 80 mL de água destilada contendo uma janela de 8 cm x 14 cm com papel germitest foi autoclavado. Uma alíquota de 1 mL de amostra de esporos do fungo foi colocada no arroz e levado a estufa por 72 h. Posteriormente, o arroz foi lavado com 1 L de água destilada previmente autoclavada e o conteúdo foi filtrado com o uso de uma gase de modo a separar somente o líquido a qual foi

armazenado em garrafa de vidro e armazenado em geladeira até a hora do uso. Obteve-se no final uma concentração de  $10^{-8}$  de esporos do fungo por mL.

### **Compatibilidade bactéria-fungo**

Para comprovar a compatibilidade entre os micro-organismos observou-se em microscópio óptico uma lâmina que continha um arraste de meio ágar, uma alíquota contendo esporos fúngicos em água e uma alíquota de bactéria em meio líquido, posterior à alíquota do fungo. As alicotas de micro-organismos foram dispostas na placa de modo a estarem próximas, mas não se tocarem. Após 48 h de crescimento do fungo e bactéria em estufa observou-se a lâmina em microscópio.

Além disso, foi colocado um disco de 1 cm de *Trichoderma longibrachiatum* T476 no centro de uma placa de petri contendo 15 mL de meio BDA. Ao redor do fungo colocaram-se alíquotas de 20 µL de meio contendo  $10^{-8}$  de bactéria e foi observado o crescimento do fungo até o mesmo cobrir toda a placa nos tempos de 12 h, 24 h e 48 h. Fotos também foram tiradas aos 20 dias após a esporulação do Trichoderma.

### **Inoculação e crescimento do tomateiro**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro, seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial do tipo 2 x 3, cujos fatores são representados por 2 genótipos (WT e linha 8-14) e 3 tratamentos (inoculado com *A. brasiliense* ABV5, co-inoculado com *A. brasiliense* ABV5 e *Trichoderma longibrachiatum* T476 e o tratamento controle não inoculado). Os ensaios foram conduzidos por um mínimo de 3 repetições.

As sementes de tomate foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 0,5% durante cinco minutos, antes do semeio. Posteriormente, realizaram-se três lavagens em água destilada seguido de imersão em álcool 70% por 2 minutos. As sementes passaram novamente por três lavagens em água destilada corrente, seguidas de imersão em água destilada por 150 minutos. Após esse tempo, dois procedimentos foram realizados. As plantas do tratamento não-inoculado e do tratamento de co-inoculação, as sementes permaneceram em imersão em água destilada por mais 60 minutos. As sementes do tratamento a receber apenas as bactérias foram retiradas da água e colocadas em imersão em solução contendo

$10^8$  células.mL<sup>-1</sup> de *A. brasiliense* ABV5 em meio DYGS durante 60 minutos.

Em seguida, foi realizado o plantio das sementes em recipientes de 100 mL contendo uma mistura de areia e terra vegetal (“Terra preta” – marca NutriVerde, composta de substrato orgânico) na proporção 1:1. As sementes foram inoculadas adicionando 2 mL meio DYGS contendo  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup> de *A. brasiliense* em cima da semente na terra, para o tratamento combinado foi adicionado 2mL de solução contendo  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup> de *A. brasiliense* ABV5 em meio DYGS e  $10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma longibrachiatum* T476 em água e para o tratamento controle 2 mL de água.

Aos 15 dias pós-plantio, as plantas foram transferidas para dois tipos de recipientes diferentes, vasos de 700 mL ou 3.500 mL contendo substrato próprio para olericultura marca Basaplant, o qual é composto de casca de pinus, turfa, carvão, vermiculita. Durante o transplantio as plantas foram reinoculadas com a solução previamente descrita, sendo adicionado 2 mL e 5 mL próximo à raiz da planta em recipientes de 700 mL e 3.500 mL, respectivamente. Aos 35 dias pós-plantio as plantas foram analisadas quanto ao seu crescimento e desenvolvimento. Para a produção dos frutos, as plantas nos vasos de 3.500 mL foram adubadas com NPK 10-10-10 e micronutrientes após o período de 35 dias e tiveram suas necessidades nutricionais supridas até a colheita dos frutos.

O plantio foi feito em dois volumes de recipientes devido à necessidade de uma grande quantidade de material vegetal, folha e raiz, em idade nova para as análises subsequentes (recipiente de 700 mL). Análises com fruto desses tratamentos também foram realizadas, um recipiente maior (recipiente de 3.500 mL) garantiu que a planta não sofresse estresse que afetasse a sua produção, levando em consideração o início da produção e primeira colheita de frutos 120 dias após a germinação. Considerando isso, uma padronização foi realizada aos 35 dias nas plantas de ambos os recipientes como descrito a seguir.

### **Avaliações quantitativas e qualitativas de crescimento**

Após 35 dias pós-plantio, foi determinado a altura das plantas e o comprimento da raiz com o uso de uma régua medindo-se da base do caule ao ápice foliar para medição de altura. Ambos os resultados expressos em cm. A área foliar também foi avaliada com um medidor de área de bancada, sendo os resultados expressos em cm<sup>2</sup>.

Cinco plantas de cada tratamento foram divididas em parte aérea (PA) e

raiz (R) e pesadas em balança digital, obtendo-se a massa fresca da PA e da R. Cada parte foi, então, organizada em sacos de papéis identificados, os quais foram levados a uma estufa com circulação forçada de ar a 75°C, por 72 h. Posteriormente, a PA e R das plantas serão novamente pesadas, determinando a massa seca das partes, com os resultados expressos em g, sendo também determinada a relação R/PA.

### Avaliações ecofisiológicas

Com o uso de equipamento Photosynch, foram realizadas medições para diferentes parâmetros em folhas completamente expandidas, sendo utilizada a segunda ou terceira folha, contadas a partir do ápice, de cada planta. As medições aconteceram durante o período da manhã. Entre os parâmetros analisados foi obtido o índice de verde (SPAD), a eficiência quântica efetiva do fotossistema II (PHi2), dissipação passiva de energia/ quenting não regulatório (PHiNO), quenching não fotoquímico (PHiNPQ), grossura das folhas, eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) e coeficiente de extinção fotoquímica (qL).

Sendo assim, analisaram-se variáveis que permitiram aferir o teor de clorofila (SPAD), a eficiência real da fotossíntese sob condições luminosas (Phi2), a presença de dano do aparato fotossintético com a fração de energia dissipada em forma não regulada (PhiNO), o potencial máximo da fotossíntese (Fv/Fm), quantidade de centros de reação do fotossistema II que estão ativos (qL), proteção da planta contra o excesso luminoso com a dissipação de energia como calor (PhiNPQ) e a grossura foliar.

### Avaliação do conteúdo de clorofila nas folhas

Foi avaliado o conteúdo de clorofila a e clorofila b em folhas de tomate. Para isso, adicionou-se 1 mL DMSO em 500 µg de tecido previamente congelado e macerado em nitrogênio líquido. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi, então, utilizado para medir o conteúdo de clorofila com o auxílio de um espectrofotômetro, sendo utilizados os comprimentos de onda de 664 e 647nm. O cálculo do conteúdo de clorofila seguiu o método de Burrows et al. 1996.

## Análises de qualidade e vida útil dos frutos

A caracterização pós-colheita dos frutos foi feita a partir das avaliações da firmeza, coloração do epicarpo, acidez titulável e teor de sólidos solúveis em dois estádios de amadurecimento, verde e maduro em cinco frutos por tratamento.

A firmeza dos frutos foi avaliada com o auxílio de um texturômetro digital (Texture Analyser, modelo TA.XT Express, UK). A ponta de prova tem 2 mm de diâmetro, com deslocamento vertical de 1 cm da superfície da casca e aprofundando-se no mesocarpo. O ensaio teve velocidade de penetração de 2 mm.s<sup>-1</sup> e os valores foram detectados e registrados quando a sonda atingiu resistência equivalente a 0,1 N.

A quantificação do teor de sólidos solúveis foi feita com um refratômetro digital de bancada modelo DRBS-300, utilizando-se duas gotas da polpa do fruto obtidas por prensa manual. O resultado foi expresso em °Brix.

O teor de acidez titulável (AT) foi determinado por titulometria com os resultados expressos em percentual de ácido cítrico (A.O.A.C, 1990). O Ratio foi determinado pela razão SS/AT.

A coloração do epicarpo foi determinada com o uso do colorímetro (Minolta, modelo CR-300, Japan), fornecendo a luminosidade ( $L^*$ ), o ângulo de cor *hue* e o índice de cor croma (C) (McGuire, 1992). Efetuaram-se três leituras em três pontos equidistantes na casca do fruto, sendo registrada a média das mesmas.

Avaliou-se também a mudança de cor durante o amadurecimento do tomate. Frutos verdes foram medidos diariamente até a mudança completa da cor da casca. Durante as medidas, os frutos foram armazenados a 11°C, considerando a temperatura mínima de segurança para armazenamento do tomate (10°C a 12°C). Uma medição comparativa foi realizada com os frutos armazenados em temperatura ambiente entre as medições, os quais também foram pesados para determinação da perda de massa fresca (%).

Determinou-se ainda a quantidade de ácido ascórbico na polpa de tomates em estado verde e maduro. Para isso, aproximadamente 1g de tecido foi macerado com 2,5 mL de ácido tricloroacético 6%. O homogenato foi filtrado em gase e separado em dois eppendorfs. Em seguida, congelou-se a amostra com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C. No dia da medição, a amostra foi descongelada e os homogenatos foram centrifugados a 14.000 x g durante 5 min a 4°C. Os pellets foram descartados e o sobrenadante

utilizado para a medição do conteúdo de AA total através de cromatografia líquida de ultraperformance (uPLC).

### **Medição da respiração em mitocôndrias isoladas do tecido vegetal**

Mitocôndrias foram purificadas para a quantificação do consumo de oxigênio, participação da COX e AOX na CTEm e atividade da enzima L-GalLDH a partir de raízes, folhas, e frutos maduros. Todo o processo de purificação das mitocôndrias foi realizado à temperatura de 4°C segundo protocolo adaptado de Oliveira et al. (2015).

### **Isolamento das mitocôndrias de raízes e frutos**

As mitocôndrias de raízes foram extraídas das plantas 35 dias após o plantio. As mitocôndrias dos frutos foram extraídas de frutos maduros fisiologicamente e com 100% da casca na cor vermelha.

As raízes foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira de modo que todo o substrato fosse retirado, seguido de lavagem com água destilada. Cerca de 20 g de raiz foi colocada em tampão de homogeneização [sacarose 0,4 moles.L<sup>-1</sup>, MOPS 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, EDTA 8 mmoles.L<sup>-1</sup>, Cys 4 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 1% (p/v) e PVP 0,4% (p/v), pH 7,5] à 4°C, durante 2 h. Após esse tempo, com o auxílio de um cadiño e areia previamente autoclavada as raízes foram maceradas em tampão de homogeneização. Enquanto que para os frutos foram usados 250 g de tecido da polpa, sendo os mesmos homogeneizados em tampão de homogeneização com o uso de um mixer (Philips-Walita, Brasil).

O homogenato foi filtrado em duas camadas de gaze e uma camada de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 2.000 x g por 15 minutos. O pellet foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 11.000 x g durante 15 minutos. Posteriormente, houve a ressuspensão do pellet originado em tampão de lavagem [sacarose 0,35 moles.L<sup>-1</sup>, MOPS 10 mmoles<sup>-1</sup>, EDTA 0,5 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2], seguido de centrifugação a 1.000 x g por 8 minutos. A seguir o pellet foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 9.000 x g por 15 minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante e o pellet ressuspandido em 1 mL do tampão de lavagem, obtendo-se assim o extrato de mitocôndrias lavadas.

Esse extrato de mitocôndrias lavadas passou por um processo de

purificação por centrifugação em gradiente de Percoll. Para isso, o extrato mitocondrial foi diluído em 30 mL de tampão de purificação [22,5 % de Percoll (v/v), manitol 0,6 moles.L<sup>-1</sup>, MOPS 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] e centrifugado a 12.000 x g durante 45 minutos.

As mitocôndrias purificadas foram coletadas em halo específico no terço inferior do tubo com ajuda de pipeta *Pasteur* e diluídas aproximadamente 10 vezes em tampão de lavagem, seguido de uma centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi novamente ressuspendido em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 1000 µL de tampão de lavagem.

### **Isolamento das mitocôndrias de folhas**

As folhas utilizadas foram coletadas das plantas 35 dias após a inoculação dos fungos. Cerca de 20 g de folhas foram homogeneizadas com o uso de um mixer em solução tampão de homogeneização [sacarose 0,3 moles.L<sup>-1</sup>, Na-tetrapirofosfato 25 mmoles.L<sup>-1</sup>, Mops 100 mmoles.L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmoles.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, PVP 1% (p/v), cisteína 2 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 1% (p/v), ascorbato 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, pH 7,5]. O homogenato foi filtrado em duas camadas de gaze e uma camada de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 3.500 x g por 5 minutos. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante centrifugado a 15.000 x g durante 20 minutos. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspenso em tampão de lavagem I [sacarose 0,3 moles.L<sup>-1</sup>, Mops 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2], seguido de centrifugação a 2.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos, sendo o *pellet* ressuspendido em 1 mL do tampão de lavagem, obtendo-se assim o extrato de mitocôndrias lavadas.

O extrato mitocondrial foi purificado com o uso de dois gradientes de Percoll feitos na noite anterior à extração. A primeira fase (leve) é composta por 25mL de tampão de lavagem II [sacarose 0,3 moles.L<sup>-1</sup>, Mops 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, pH 7,2], 11 mL de PVP a 20 % e Percol a 28%. A segunda fase (pesada) é composta por 25 mL de tampão de lavagem II e Percoll a 45%. Em um mesmo tubo, acrescentaram-se partes iguais de fase pesada e de fase leve, o tubo foi colocado na geladeira e utilizado no dia seguinte. Na etapa de purificação, o extrato foi colocado no gradiente de Percoll e centrifugado a 40.000 x g por 40 minutos, com

a aceleração da centrífuga de modo lento e desaceleração da centrífuga desligada.

As mitocôndrias purificadas foram coletadas em halo específico no terço inferior do tubo com o auxílio de uma pipeta e diluídas aproximadamente 10 vezes em tampão de lavagem II, seguido de centrifugação a 28.000 x g por 15 minutos.

Posteriormente, o *pellet* foi novamente ressuspendido em tampão de lavagem e novamente centrifugado a 28.000 x g durante 15 minutos mais duas vezes. Por fim, o *pellet* foi ressuspendido em 1000 µL de tampão de lavagem.

### **Quantificação das proteínas no extrato mitocondrial**

Para a quantificação da concentração de proteínas utilizou-se um espectrofotômetro, com leitura no comprimento de onda de 595 nm seguindo metodologia descrita por Bradford (1976) utilizando BSA como proteína padrão. O processo foi realizado em duplicata com a determinação do conteúdo de proteínas em 50 µL de extrato de mitocôndrias purificadas.

### **Quantificação da atividade respiratória**

A atividade respiratória das mitocôndrias foi quantificada pelo uso de um eletrodo do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK), através do método polarográfico. Todo o procedimento ocorreu à temperatura de 25°C, utilizando o extrato mitocondrial em tampão de reação [manitol 0,35 moles.L<sup>-1</sup>, tampão fosfato 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, KCl 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2].

A respiração mitocondrial foi medida pelo consumo de O<sub>2</sub> utilizando como substrato respiratório NADH durante a medida da atividade respiratória adicionou-se na câmara de reação ADP para verificação da taxa de fosforilação e para avaliação do nível de acoplamento das mitocôndrias, de acordo com Oliveira et al. (2017).

Posteriormente, foi adicionado n-PG, (para mitocôndrias de raiz e folha) e SHAM para mitocôndrias de fruto, para inibir a AOX, sendo determinado o consumo de O<sub>2</sub>, seguido da adição de azida de potássio, inibidor da COX e registrado, novamente, o consumo de O<sub>2</sub>. Deste modo, foi possível determinar a participação de cada oxidase terminal no processo respiratório.

A concentração final dos substratos e inibidores foi de 8 mmoles.L<sup>-1</sup> para NADH; 0,5 mmoles.L<sup>-1</sup> para ADP; 0,20 mmoles.L<sup>-1</sup> para nPG e 5 mmoles.L<sup>-1</sup> para SHAM.

## **Determinação do efeito da L-GalLDH na respiração em mitocôndrias isoladas do tecido vegetal**

Na determinação da influência da atividade L-GalLDH na respiração foi utilizado o extrato purificado das mitocôndrias e quantificada a atividade respiratória na presença de 10 µL de L-GalL 1 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato oxidável em substituição ao NADH. Deste modo, a adição de ADP permitiu a determinação do coeficiente respiratório e da taxa de fosforilação. Na presença de n-PG ou SHAM obteve-se a participação da COX na atividade respiratória e, por fim, com adição da azida de potássio, inibidor da COX, foi determinada a participação da AOX, nesse caso utilizando L-GalL como substrato respiratório e com a participação da L-GalLDH na CTEm.

### **Quantificação da atividade da enzima L-GalLDH em mitocôndrias isoladas**

Com o auxílio de um espectrofotômetro foi determinada a atividade da enzima L-GalLDH. Para isso, foi medida a redução do citocromo c na presença de L-GalL 5 mmoles.L<sup>-1</sup>. Mitocôndrias purificadas foram condicionadas em meio contendo tampão Tris 50 mmoles.L<sup>-1</sup> em pH 7,8; citocromo c 5 mmoles.L<sup>-1</sup> e L-GalL 5 mmoles.L<sup>-1</sup>. Para permitir a entrada do citocromo c na organela adicionou-se detergente Triton 5%. A atividade da L-GalLDH foi observada com a inibição da COX, sendo adicionado azida 3 mmoles.L<sup>-1</sup>. A redução do citocromo c foi registrada durante 2 minutos, com medição a cada 2 segundos. As análises foram feitas no comprimento de onda de 550 nm e os dados finais serão expressos em citocromo c reduzido. min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>. Determinou-se também a atividade da L-GalLDH em condições de estímulo e inibição da AOX, para isso utilizaram 5 mmoles.L<sup>-1</sup> de piruvato para estímulo e 5 mmoles.L<sup>-1</sup> de SHAM e de nPG para medição em condições de inibição da AOX.

### **Extração de RNA para determinação da expressão gênica de genes de interesse da CTEm e do metabolismo do ácido ascórbico**

O RNA total foi isolado de 250 mg de raízes, folhas e frutos maduros de tomates previamente congelados em nitrogênio, com Trizol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi medida usando um espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop 2000c. O RNA também foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com coloração com brometo

de etídio. O cDNA foi construído utilizando 4 µg de RNA, utilizando o kit GoScript™ Reverse (Promega).

O RNA foi utilizado para verificar a expressão gênica da L-GalLDH de modo a se confirmar a mutação do genótipo utilizado em raízes, folhas e frutos maduros de tomate. A expressão da L-GalLDH também foi analisada através dos diferentes tratamentos com o intuito de verificar se os micro-organismos utilizados interferem na mesma. Outros genes de interesse relacionados com a CTEm, como a AOX e da Ubiquinona, também foram medidos com RNA. Utilizaram 4 primers específicos da proteína AOX (AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX2), um primer para Ubiquinona e um primer para L-GalLDH (Tabela Suplementar 1).

Para analisar a expressão gênica, as reações de RT-qPCR foram realizadas com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A RT-qPCR foi conduzida usando os sistemas de PCR em tempo real Applied Biosystems StepOneTM, de acordo com o fabricante, sob condições padrão.

### Análises Estatísticas

Todo o experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Análises de crescimento, ecofisiologia e pós-colheita de frutos utilizaram 5 plantas como repetições e a comparação foi feita em esquema fatorial 2x3 (Genótipo X Tratamento de Inoculação). Os dados foram submetidos ao teste Tukey a 5% de probabilidade.

As análises dependentes de mitocôndrias como respiração e atividade da L-GalLDH foram realizadas em triplicatas, sendo uma amostra composta de 20 plantas diferentes. A taxa respiratória das mitocôndrias foi comparada em fatorial duplo 3X6 (Tipo de Respiração X Tratamentos totais), considerando genótipos e inoculação como tratamentos independentes. O mesmo tipo de comparação foi realizado para atividade da L-GalLDH, onde o fatorial foi 4X6 (Tratamento sobre as mitocôndrias X Tratamentos totais). Os dados foram submetidos ao teste Tukey a 5% de probabilidade.

A expressão gênica foi realizada em duplicata com cada amostra sendo composta por 5 plantas diferentes e comparada através do teste T, tendo como ponto fixo de comparação os tratamentos controle relativos a cada genótipo a qual corresponde a uma expressão gênica de valor 1. Na comparação entre genótipos WT e 8-14, o valor fixo 1 foi o genótipo WT.

## RESULTADOS

### Compatibilidade entre *A. brasiliense* ABV5 e *Trichoderma longibrachiatum* T476

Verificou-se através da observação de lâminas em microscopia que o fungo *T. longibrachiatum* T476 e a bactéria *A. brasiliense* ABV5, são capazes de crescer juntos, sendo que a bactéria é capaz de crescer ao redor da hifa do fungo (Figura 3B). Observa-se também através da microscopia óptica que as células bacterianas se misturam com os esporos fúngicos em um mesmo ambiente (Figura 3A).

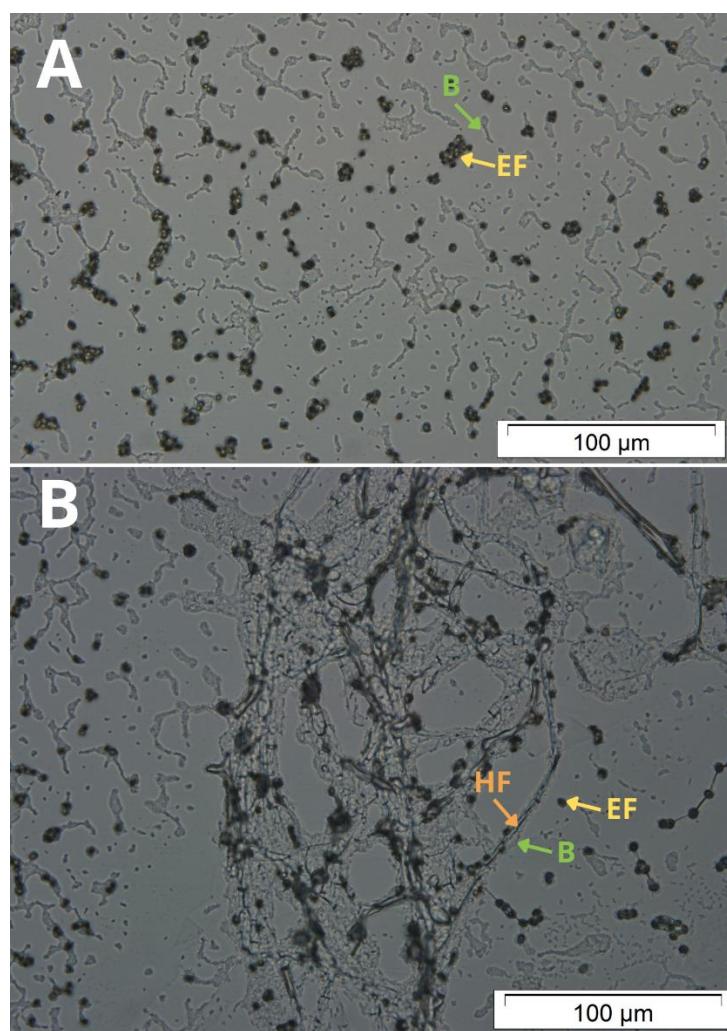


Figura 3: Microscopia óptica de cepas de *A. brasiliense* ABV5 em crescimento junto a esporos de *T. longibrachiatum* T476. A imagem superior (A) representa esporos fúngicos (EF) em proximidade a células bacterianas (B). A imagem inferior (B) representa as hifas fúngicas em crescimento (HF) com células de bactéria ao redor da mesma.

Ao observar o desenvolvimento de ambos em placa, verifica-se que na presença da bactéria as hifas fúngicas cresceram mais rápido (Figura 4), favorecendo a ocupação de toda a placa (Figura 5). Com um crescimento da hifa do fungo de 1,5 cm em 12 h e 3,5 cm em 24 h após a montagem da placa, a associação *A. brasiliense* ABV5 + *T. longibrachiatum* T476 promoveu ( $P<0,05$ ) o crescimento do fungo (Figura 4). As hifas fúngicas foram capazes de crescer em direção a *A. brasiliense* ABV5, ocupando toda a placa, inclusive passando por cima da bactéria (Figura 5). Contudo, ao se considerar um tempo maior de incubação (15 dias), é possível comprovar que apesar de haver uma maior quantidade de hifas na placa com bactéria em comparação aos outros tempos de incubação, o fungo não foi capaz de produzir esporos como o que estava em uma placa sem a presença da bactéria.

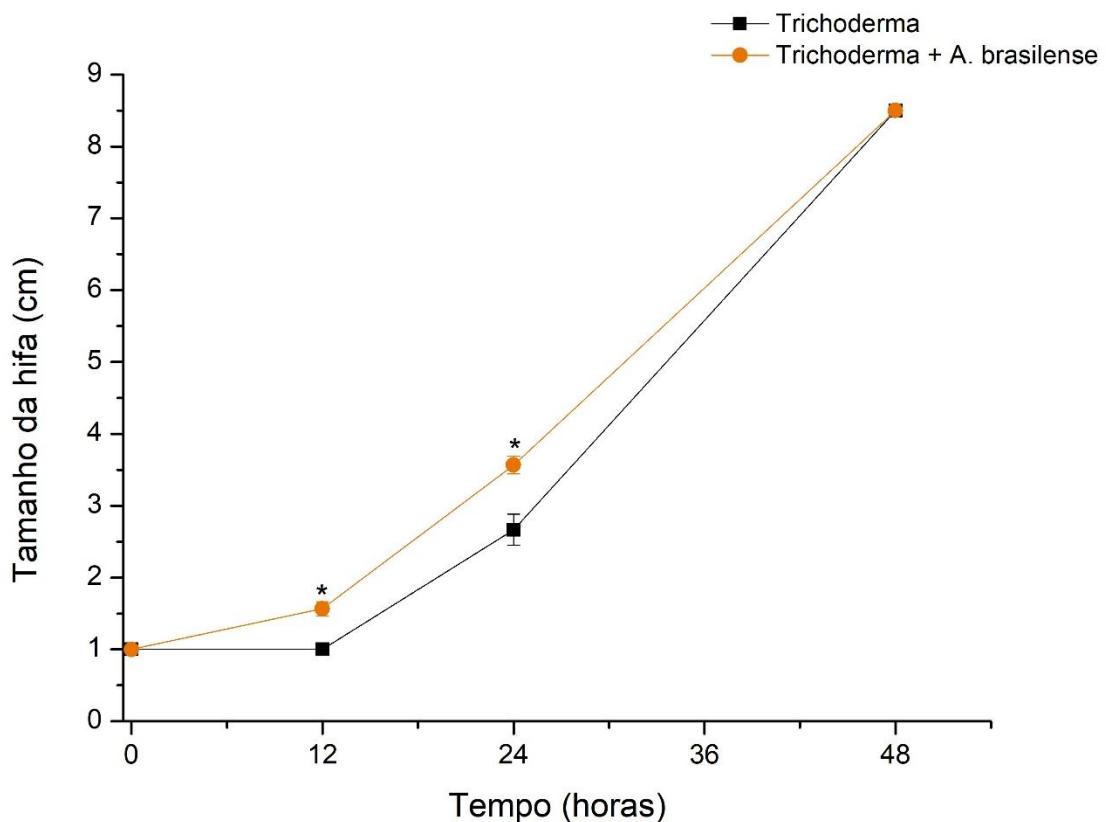


Figura 4: Representação gráfica do crescimento de hifa de *Trichoderma longibrachiatum* T476 na presença (cinza) e ausência de *A. brasiliense* ABV5 (preto). \* representam valores significativos quanto ao teste t de Student a 5% de probabilidade.

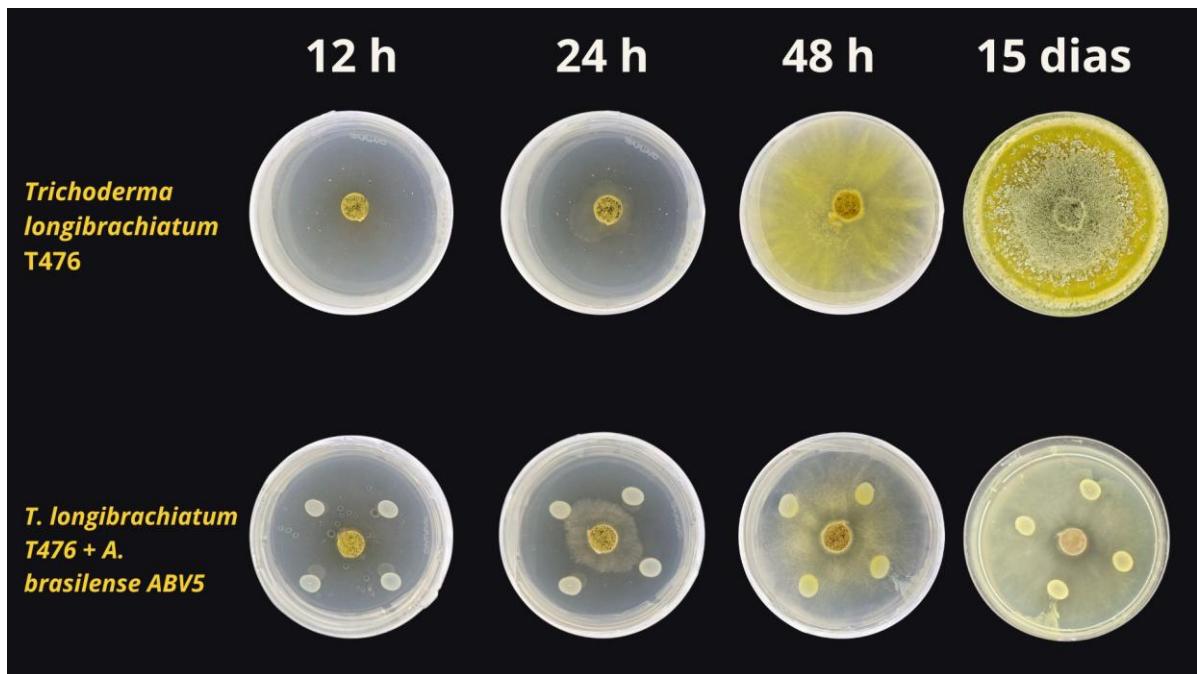


Figura 5: Placas de petri com *A. brasiliense* ABV5 e *Trichoderma longibrachiatum* T476 em diferentes tempos de crescimento.

### **A presença da bactéria melhora o crescimento e desenvolvimento do tomateiro**

Após a inoculação com a bactéria ou em tratamentos de coinoculação em conjunto com o fungo *T. longibrachiatum* T476, as plantas de tomate apresentaram diferenças expressivas em seu crescimento, como pode ser observado nas figuras a seguir. Independente do recipiente em que as plantas se encontravam, é possível observar que a inoculação e coinoculação produziram plantas maiores do que o controle (Figura 6). Ao considerar a raiz das plantas onde há o contato dos micro-organismos, é possível observar que a presença de *A. brasiliense* ABV5 (em associação ou não com *Trichoderma longibrachiatum* T476) também promoveu maior crescimento de raiz para ambos os genótipos nos dois recipientes (Figuras 7 e 8).

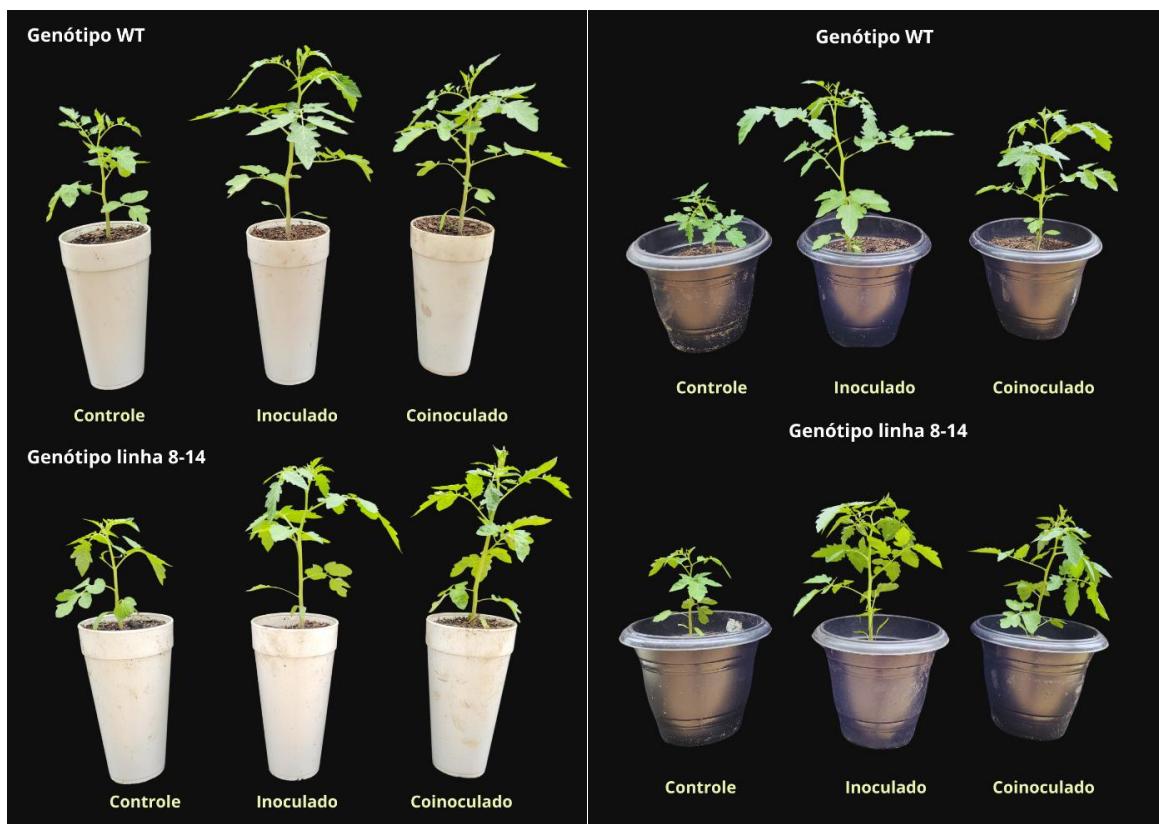


Figura 6: Na esquerda, tomateiro em recipientes de 700 mL aos 35 dias pós-plantio. Na direita, o tomateiro com crescimento em recipientes maiores com 3.500 mL aos 35 dias pós-plantio. No tratamento controle não há inoculação. Tratamento inoculado conta somente com *A. brasiliense* ABV5. Tratamento coinoculado conta com *A. brasiliense* ABV5 e *T. longibrachiatum* T476. Genótipo linha 8-14 conta com mutação para subexpressão da enzima L-GalLDH.



Figura 7: Raízes de tomateiro aos 35 dias após o plantio com crescimento em recipiente de 700 mL. No tratamento controle não há inoculação. Tratamento inoculado conta somente com *A. brasiliense* ABV5. Tratamento coinoculado conta com *A. brasiliense* ABV5 e *T. longibrachiatum* T476. Genótipo linha 8-14 conta com mutação para subexpressão da enzima L-GalLDH.



Figura 8: Raízes de tomateiro aos 35 dias após o plantio com crescimento em recipiente de 3.500 mL. No tratamento controle não há inoculação. Tratamento inoculado conta somente com *A. brasiliense* ABV5. Tratamento coinoculado conta com *A. brasiliense* ABV5 e *T. longibrachiatum* T476. Genótipo linha 8-14 conta com mutação para subexpressão da enzima L-GalLDH.

Analizando o crescimento da planta, em ambos os recipientes, verifica-se que as plantas inoculadas tiveram ganhos significativos em relação ao tratamento controle na altura da parte aérea (P.A.) e comprimento de raiz (Figura 9). Nos recipientes de menor volume, a altura das plantas inoculadas e coinoculadas não diferiu estatisticamente em nenhum dos genótipos, mas em relação ao controle houve um aumento ( $P<0,05$ ) de 5 cm para ambos os genótipos. no comprimento de raiz, o efeito da inoculação apenas com *A. brasiliense* também não diferiu da coinoculação, porém, a presença destes micro-organismos impactou significativamente no crescimento das raízes do tomateiro com um ganho médio de 10 cm no comprimento de raiz para o genótipo WT e 15 cm para o genótipo 8-14.

Considerando os recipientes de 3.500 mL, verificou-se o mesmo padrão de ganhos em altura de P.A. e comprimento de raiz nas plantas inoculadas e

coinoculadas, porém, verifica-se também que para altura da P.A. o tratamento apenas com a bactéria apresentou valores maiores ( $P<0,05$ ) do que os tratamentos coinoculados. Considerando a ausência de bactéria no tratamento controle, a mesma promoveu um ganho médio de 15 cm de altura na P.A dos tomateiros para ambos os genótipos, enquanto que no tratamento coinoculado o aumento foi de 10 cm (Figura 9). No crescimento das raízes das plantas, contudo, a inoculação e coinoculação não diferiram entre si, porém em ambos os genótipos foi obtido maior crescimento de raiz ao menos 1,5 vezes maior que no controle.

A inoculação também aumentou o número de folhas nas plantas, resultando em média duas folhas a mais em cada genótipo em ambos os recipientes (Figura 10). A presença da bactéria também estimulou o crescimento das folhas com o dobro de área foliar em ambos os genótipos nos tratamentos inoculados e coinoculado nos recipientes de 700 mL. É importante ainda ressaltar que a área foliar nos recipientes de 700 mL variou em relação aos genótipos, com o mutante 8-14 apresentando uma área foliar menor que o genótipo WT. No recipiente de 3.500 mL houve também uma diferença ( $P<0,05$ ) entre os valores para os tratamentos inoculados e coinoculados. Com isso, para ambos os genótipos, o tratamento inoculado aumentou em 5 vezes a área foliar, enquanto o tratamento coinoculado estimulou um aumento de 4 vezes da área foliar das plantas controle (Figura 10).

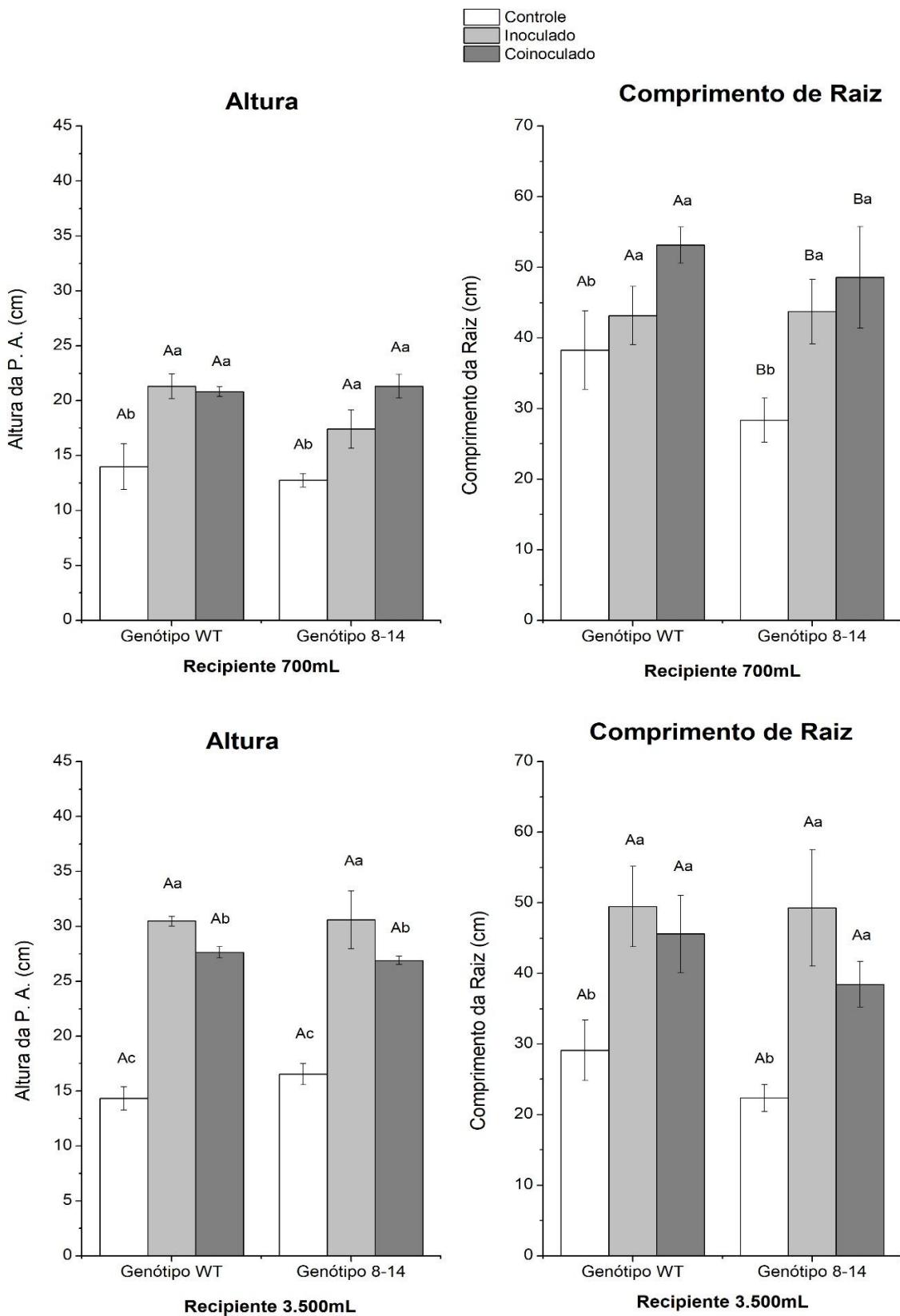


Figura 9: Altura da parte aérea e comprimento da raiz de tomateiros com 35 dias após o plantio. Na parte superior se encontram tomateiros em recipientes de 700 mL e na parte inferior tomateiros crescendo em recipientes de 3.500 mL. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo.

Barras brancas representam o tratamento controle (não-inoculado), barras cinza-claro o tratamento inoculado e barras cinza-escuro o tratamento coincoulado. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

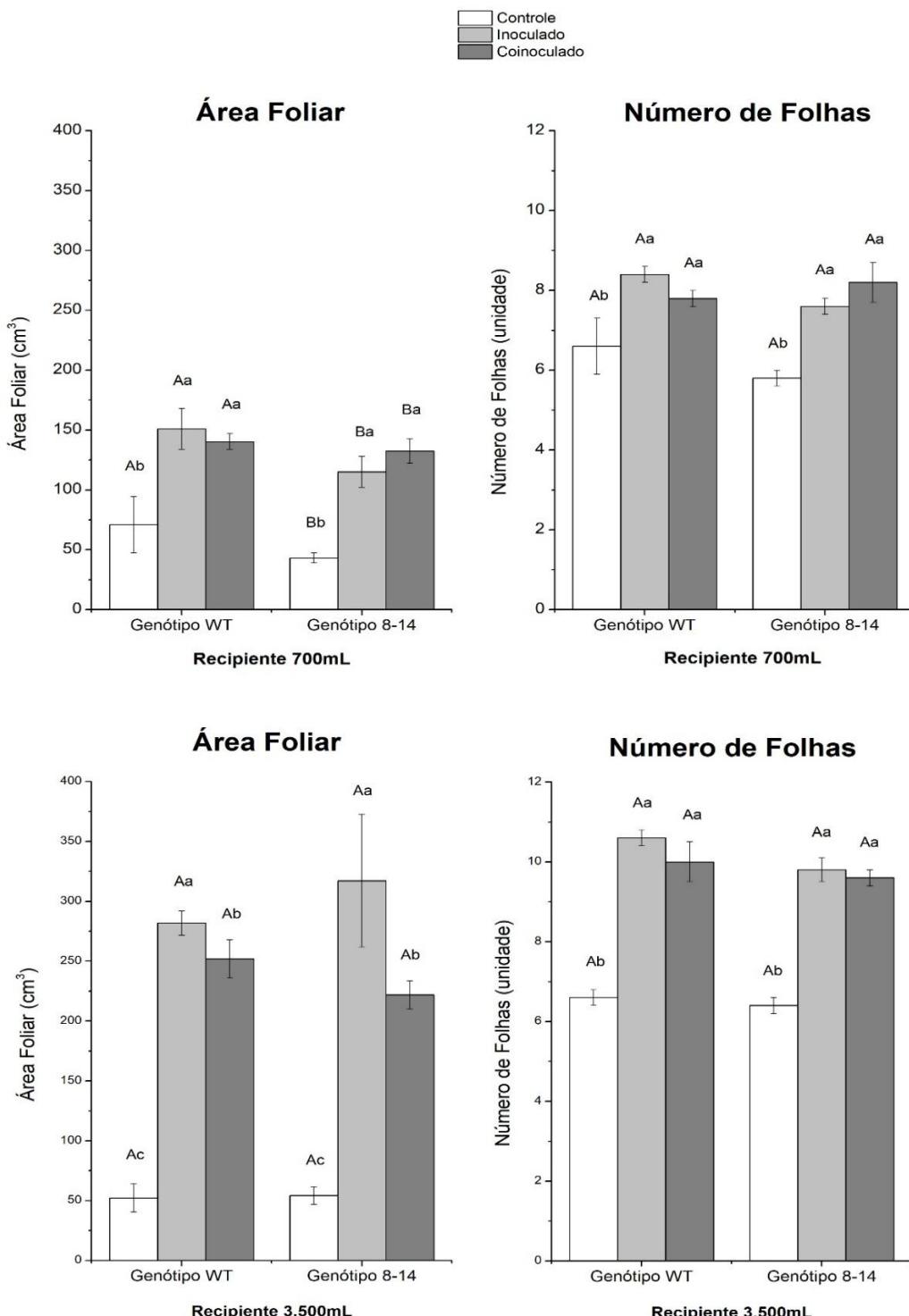


Figura 10: Área foliar e número de folhas de tomateiros com 35 dias após o plantio. Na parte superior se encontram tomateiros em recipientes de 700 mL e na parte inferior tomateiros crescendo em recipientes de 3.500 mL. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas

representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Barras brancas representam o tratamento controle (não-inoculado), barras cinza-claro o tratamento inoculado e barras cinza-escuro o tratamento coinoculado. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

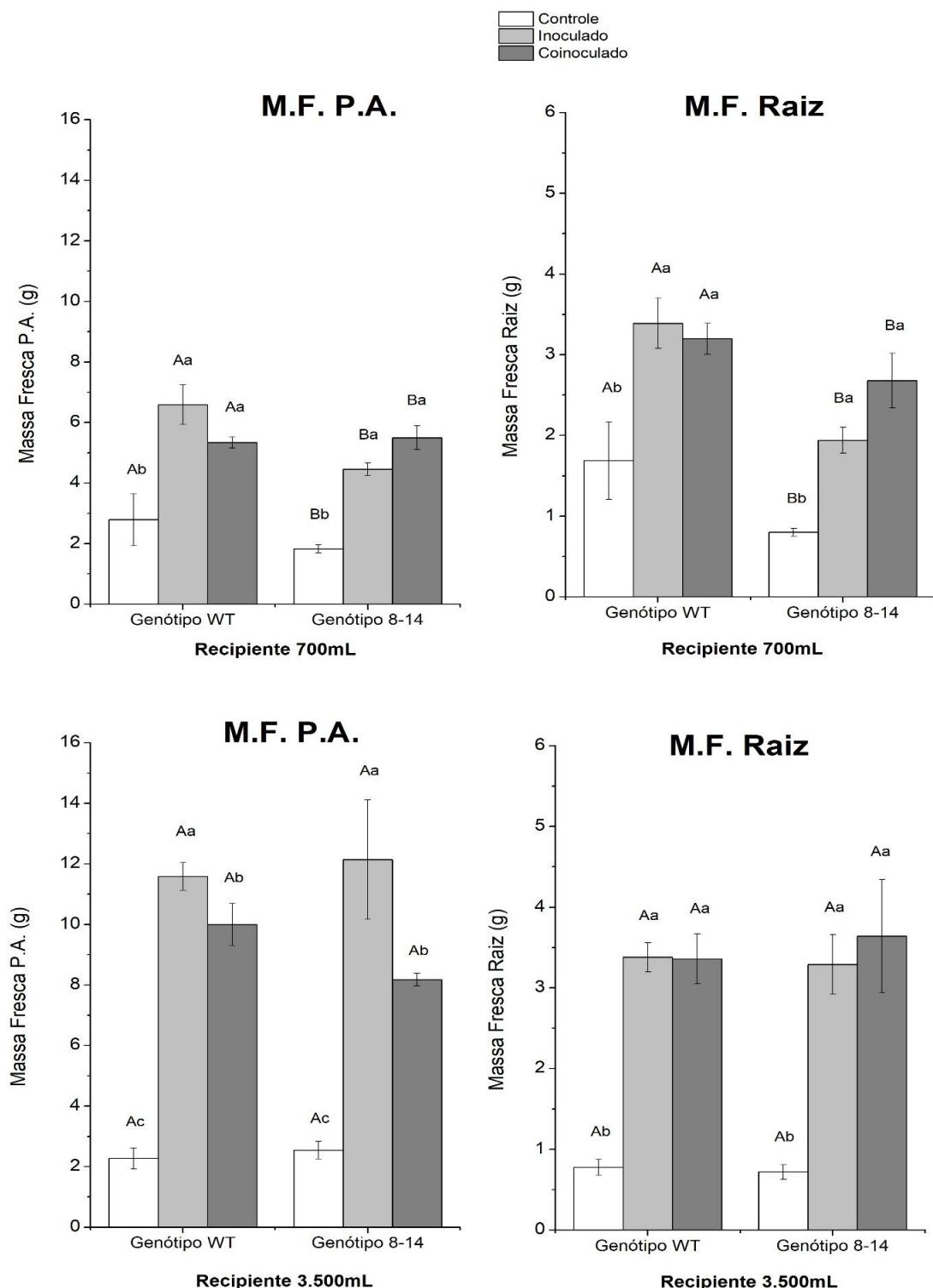


Figura 11: Massa fresca da parte aérea (P.A.) e da raiz em tomateiros com 35 dias após o plantio. Na parte superior se encontram tomateiros em recipientes de 700 mL e na

parte inferior tomateiros crescendo em recipientes de 3.500 mL. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Barras brancas representam o tratamento controle (não-inoculado), barras cinza-claro o tratamento inoculado e barras cinza-escuro o tratamento coinoculado. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

Na avaliação da massa fresca das plantas cultivadas nos recipientes de 700 mL verificou-se uma diferença significativa entre os genótipos WT e 8-14, com o último apresentando valores menores tanto para massa fresca da P.A. quanto da raiz (Figura 11). Na avaliação individualizada de cada genótipo, o que se observa é que não houve diferença ( $P<0,05$ ) para a massa fresca entre plantas inoculadas e coinoculadas. Porém, na comparação com o controle, verificou-se o dobro de massa fresca da P.A. e da raiz no genótipo WT, enquanto no genótipo 8-14 o aumento da massa fresca da P.A. e raiz foi cerca de 2,5 vezes a do controle devido à presença da bactéria. Para as plantas cultivadas nos recipientes de 3.500 mL esse padrão se repetiu na análise da massa fresca de raiz, porém com aumentos mais expressivos sendo verificado valores 4 vezes maiores em ambos os genótipos na presença de bactéria nos tratamentos inoculados e coinoculados (Figura 11). Porém, a massa fresca da P.A. nas plantas inoculadas e coinoculadas diferiram entre si ( $P<0,05$ ) com massa fresca maior nas plantas inoculadas apenas com a bactéria em ambos os genótipos. O aumento médio da massa fresca da P.A. nessas plantas foi cerca de 4 a 5 vezes em relação ao controle.

Para a massa seca da P.A., massa seca da raiz e massa seca total, as plantas inoculadas e coinoculadas também não diferiram ( $P<0,05$ ) entre si, independente do recipiente onde foram cultivadas. Porém, observa-se um aumento expressivo na massa seca (P.A., raiz e total) entre os diferentes volumes de recipientes utilizados (Figura 12). No recipiente de menor volume a massa seca da raiz e massa seca da P.A. no genótipo mutante foi menor do que no genótipo WT. No tratamento inoculado, a presença de bactéria foi capaz de dobrar a quantidade de massa seca de raiz e da PA, e consequentemente na massa seca total da planta. no recipiente de 3.500 mL, o mesmo efeito ocorreu com um aumento de 6 vezes mais massa na raiz e 5 vezes na parte aérea, com isso um aumento na massa seca total foi de 7 vezes.

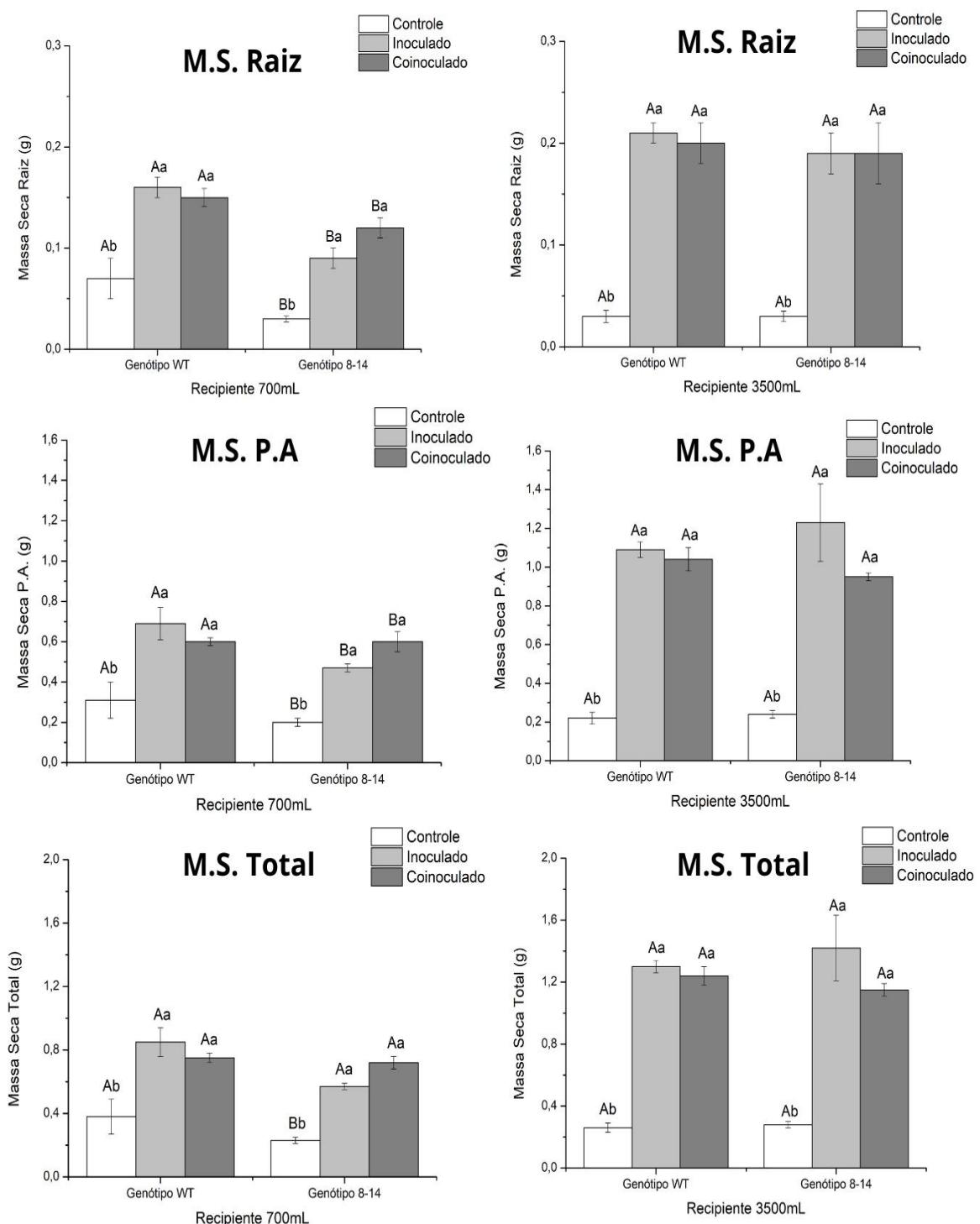


Figura 12: Massa seca da parte aérea (P.A.) da raiz e total em tomateiros com 35 dias após o plantio. Na parte superior se encontram tomateiros em recipientes de 700 mL e na parte inferior tomateiros crescendo em recipientes de 3.500 mL. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Barras brancas representam o tratamento controle (não-inoculado), barras cinza-claro o tratamento inoculado e barras cinza-escuro o tratamento coinoculado. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

Apesar das mudanças no crescimento das plantas, a avaliação de variáveis ecofisiológicas das mesmas não mostrou efeito significativo em função da inoculação com a bactéria isolada ou em coinoculação com o fungo (Tabela 1 e 2). Exceção apenas para a variação significativa no nível de verde da folha medido com o SPAD nas plantas cultivadas em ambos os recipientes. Nas plantas cultivadas no recipiente de 700 mL, o índice SPAD foi maior para as plantas inoculadas, não diferindo, porém, entre plantas controle (não inoculadas) e aquelas coinoculadas, independente do genótipo (Tabela 1). Para as plantas cultivadas nos recipientes de 3.500 mL, em ambos os genótipos, o índice SPAD foi maior nas plantas coinoculadas, seguido das plantas inoculadas que diferiram na comparação com as plantas controle, sendo essas as que apresentaram o menor índice SPAD (Tabela 2). Ainda nos aspectos ecofisiológicos, o qL das plantas cultivadas no recipiente de 3.500 mL apresentou valores maiores no genótipo WT em comparação com as plantas do genótipo 8-14, enquanto nas plantas cultivadas no recipiente de 700 mL não houve diferença significativa no índice qL em ambos os genótipos (Tabelas 1 e 2). As plantas cultivadas no recipiente de 700 mL, contudo, apresentaram diferenças na espessura de folha, sendo verificado folhas mais espessas em plantas do genótipo WT na comparação com o genótipo 8-14, o que não foi verificado nas plantas cultivadas no recipiente maior (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1: Análises ecofisiológicas das plantas de tomate em recipientes de 700 mL

Tratamentos	Espessura da Folha	SPAD	Fv/Fm	Phi2	PhiNPQ	PhiNo	qL
<b>Controle (WT)</b>	1,75± 0,25 Aa	32,80± 2,17 Ab	0,70± 0,01 *ns	0,50± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,42± 0,01 *ns
<b>Inoculado (WT)</b>	1,71± 0,25 Aa	39,32± 1,00 Aa	0,71± 0,01 *ns	0,50± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,41± 0,01 *ns
<b>Coinoculado (WT)</b>	1,75± 0,18 Aa	34,90± 0,95 Ab	0,71± 0,01 *ns	0,51± 0,01 *ns	0,23± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,42± 0,02 *ns
<b>Controle (8-14)</b>	1,57± 0,11 Ba	33,84 ± 1,43 Ab	0,70± 0,01 *ns	0,49± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,39± 0,01 *ns
<b>Inoculado (8-14)</b>	1,42± 0,14 Ba	36,27± 0,93 Aa	0,71± 0,01 *ns	0,47± 0,03 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,26± 0,01 *ns	0,37± 0,04 *ns
<b>Coinoculado (8-14)</b>	1,16± 0,11 Ba	33,30± 0,51 Ab	0,71± 0,01 *ns	0,51± 0,01*ns	0,23± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,42± 0,01 *ns

Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%. SPAD: nível relativo de clorofila. Fv/Fm: eficiência quântica máxima do fotossistema II. Phi2: eficiência quântica efetiva do fotossistema II. PhiNPQ: quenching não fotoquímico. PhiNO: dissipação passiva de energia/ quenting não regulatório. qL: coeficiente de extinção fotoquímica.

Tabela 2: Análises ecofisiológicas das plantas de tomate em recipientes de 3.500 mL

Tratamentos	Espessura da Folha	SPAD	Fv/Fm	Phi2	PhiNPQ	PhiNo	qL
<b>Controle (WT)</b>	2,25± 0,01 *ns	33,35± 0,01 Ac	0,70± 0,01 *ns	0,52± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,23± 0,01 *ns	0,44± 0,01 Aa
<b>Inoculado (WT)</b>	2,13± 0,01 *ns	37,96± 0,01 Ab	0,71± 0,01 *ns	0,50± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,24± 0,01 *ns	0,42± 0,01 Aa
<b>Coinoculado (WT)</b>	2,02± 0,01 *ns	39,57± 0,01 Aa	0,70± 0,01 *ns	0,50± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,42± 0,01 Aa
<b>Controle (8-14)</b>	1,89± 0,01 *ns	35,01± 0,01 Ac	0,70± 0,01 *ns	0,49± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,40± 0,01 Ba
<b>Inoculado (8-14)</b>	1,53± 0,01 *ns	36,47± 0,01 Ab	0,70± 0,01 *ns	0,49± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,25± 0,01 *ns	0,41± 0,01 Ba
<b>Coinoculado (8-14)</b>	1,87± 0,01 *ns	40,12± 0,01 Aa	0,71± 0,01 *ns	0,49± 0,01 *ns	0,23± 0,01 *ns	0,23± 0,01 *ns	0,39± 0,01 Ba

Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

Considerando os valores significativos para o índice SPAD, foi analisado o conteúdo de clorofila das plantas (Figura 13). Os resultados mostram que nas plantas cultivadas no recipiente de 700 mL apresentaram um conteúdo de clorofila a maior nas plantas inoculadas e coinoculadas no genótipo WT, enquanto no genótipo 8-14 não foi verificado diferença ( $P<0,05$ ). As plantas controle do genótipo 8-14 têm conteúdo de clorofila a maior ( $P<0,05$ ) que as plantas do genótipo WT (Figura 13). Porém, considerando apenas as plantas não inoculadas, as plantas do genótipo 8-14 apresentam maior conteúdo de clorofila a do que as plantas do genótipo WT, bem como de clorofila total. Considerando o conteúdo de clorofila b das plantas, percebe-se que houve efeito devido à inoculação para esse genótipo. No genótipo WT, as plantas coinoculadas apresentaram menor conteúdo de clorofila b em comparação às plantas não inoculadas e aquelas inoculadas apenas com a bactéria, porém, considerando as plantas não inoculadas desse genótipo, o mesmo tem maior conteúdo de clorofila b do que o genótipo 8-14. Nas plantas do genótipo 8-14, o conteúdo de clorofila b foi maior no tratamento inoculado seguido do tratamento coinoculado com o tratamento controle apresentando novamente os menores valores. Esse mesmo padrão se repetiu para clorofila total em ambos os genótipos.

Nas plantas cultivadas nos recipientes de maior volume, 3.500 mL, os padrões apresentados foram diferentes. O conteúdo de clorofila a nas plantas dos genótipos WT e 8-14 coinoculadas foi maior, enquanto nas plantas controle e naquelas inoculadas apenas com a bactéria, conteúdo de clorofila a não diferiu entre si (Figura 13). Em termos do conteúdo de clorofila b, as plantas inoculadas do genótipo WT apresentaram o maior valor, seguido de plantas controle, enquanto as plantas coinoculadas apresentaram o menor conteúdo de clorofila b. Nas plantas do genótipo 8-14, os resultados foram diferentes, sendo verificado o maior conteúdo de clorofila b nas plantas não inoculadas, com as plantas coinoculadas apresentando o menor conteúdo de clorofila b (Figura 13). Para o conteúdo de clorofila total, as plantas coinoculadas apresentam o menor conteúdo de clorofila total em ambos os genótipos. As plantas do genótipo 8-14 apresentam o maior conteúdo de clorofila total nas plantas controle, enquanto no genótipo WT o maior conteúdo de clorofila total foi verificado nas plantas inoculadas apenas com a bactéria.

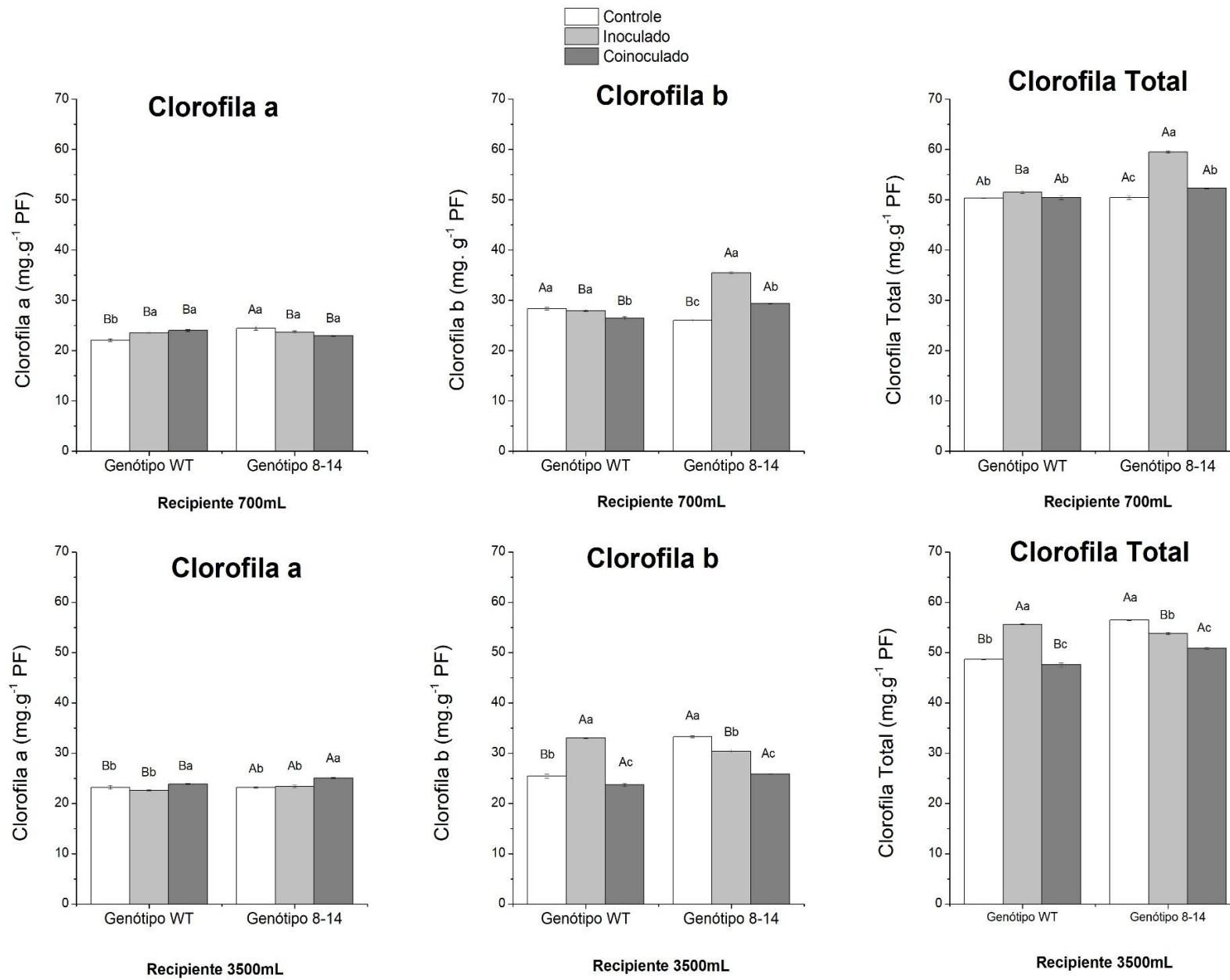


Figura 13: Conteúdo (mg. g PF<sup>-1</sup>) de clorofila a, clorofila b e clorofila total em plantas de tomate aos 35 dias após o plantio. Na parte superior se refere aos tomateiros cultivados em recipientes de 700 mL e na parte inferior as plantas cultivadas em recipientes de 3.500 mL. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Barras brancas representam o tratamento controle (não-inoculado), barras cinzas-claro o tratamento inoculado e barras cinzas-escuras o tratamento coinoculado. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%.

#### **A. brasiliense ABV5 altera características pós-colheita de frutos de tomate e a quantidade de ácido ascórbico na polpa dos frutos**

Considerando a influência que micro-organismos promotores do crescimento apresentam para a planta, a análise de atributos de pós-colheita indicou que a presença da bactéria *A. brasiliense* ABV5 o fungo *T. longibrachiatum* T476 foi capaz de alterar características do fruto como acidez e ratio (SS/AT), os quais estão ligados à palatibilidade do fruto (Tabelas 3 e 4). Os frutos de tomates verdes provenientes de plantas inoculadas com a bactéria apresentaram maior ratio em comparação aos frutos das plantas não inoculadas e aos frutos provenientes de plantas coinoculadas em ambos os genótipos, não havendo uma diferença em relação a outros aspectos como firmeza, cor e sólidos solúveis, porém esses mesmos frutos apresentaram média de acidez titulável menor (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros pós-colheita em frutos verdes de tomate

Tratamentos (Fruto Verde)	Firmeza (N)	Cor (h*)	A.T. (% ácido cítrico)	S.S. (°Brix)	Ratio (SS/AT)
<b>Controle (WT)</b>	6,04± 0,29 Bb	120,81± 0,43 Ba	0,33± 0,00 Aa	4,14± 0,11 *ns	12,76± 0,31 Bb
<b>Inoculado (WT)</b>	6,97± 0,47 Bab	120,85± 0,40 Ba	0,23± 0,01 Ab	3,72± 0,15 *ns	17,03± 1,16 Ba
<b>Coinoculado (WT)</b>	7,89± 0,43 Ba	120,74± 0,35 Ba	0,32± 0,00 Aab	3,40± 0,26 *ns	10,85± 1,10 Bb
<b>Controle (8-14)</b>	8,10± 0,38 Aa	121,96± 0,19 Aa	0,28± 0,04 Aa	3,88± 0,37 *ns	14,77± 1,60 Ab
<b>Inoculado (8-14)</b>	7,64± 0,53 Aa	121,11± 0,51 Aa	0,23± 0,00 Ab	4,20± 0,04 *ns	17,65± 0,50 Aa
<b>Coinoculado (8-14)</b>	7,70± 0,33 Aa	122,05± 0,33 Aa	0,26± 0,01 Aab	4,21± 0,08 *ns	16,25± 1,29 Ab

Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5%. AT: acidez titulável. SS: sólidos solúveis.

Tabela 4: Parâmetros pós-colheita em frutos maduros de tomate

Tratamentos (Fruto Maduro)	Firmeza (N)	Cor (h*)	A.T. (% ácido cítrico)	S.S. (°Brix)	Ratio (SS/AT)
<b>Controle (WT)</b>	2,64 ± 0,35 *ns	45,71 ± 0,25 *ns	0,24 ± 0,01 Ba	5,44± 0,13 Aa	21,84± 0,46 Ab
<b>Inoculado (WT)</b>	2,85 ± 0,23 *ns	45,37 ± 0,68 *ns	0,18± 0,01 Bab	5,02± 0,28 Aab	29,45± 2,74 Aa
<b>Coinoculado (WT)</b>	3,11 ± 0,17 *ns	44,68 ± 0,44 *ns	0,17± 0,00 Bb	4,58± 0,24 Ab	26,73± 1,41 Aab
<b>Controle (8-14)</b>	3,38 ± 0,25 *ns	45,55 ± 0,24 *ns	0,21± 0,01 Aa	4,5± 0,21 Ab	22,17± 1,46 Ab
<b>Inoculado (8-14)</b>	3,72 ± 0,32 *ns	45,42 ± 0,31 *ns	0,22± 0,02 Aa	5,86± 0,16 Aa	27,44± 2,65 Aa
<b>Coinoculado (8-14)</b>	2,77 ± 0,29*ns	46,99 ± 0,71 *ns	0,26± 0,02 Aa	5,06± 0,19 Ab	19,98± 2,00 Aab

Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5% de probabilidade. AT: acidez titulável. SS: sólidos solúveis.

Nos frutos maduros provenientes de plantas inoculadas verificou-se maior ratio em comparação a frutos de plantas não inoculadas (Tabela 4). Houve também variação quanto ao teor de sólidos solúveis nos frutos maduros. Os frutos das plantas do genótipo WT coinoculadas apresentaram a menor média para o teor de sólidos solúveis, com os frutos das plantas não inoculadas ou inoculadas apenas com a bactéria, não diferindo entre si em relação ao teor de sólidos solúveis. Porém, no genótipo 8-14, os maiores valores para o teor de sólidos solúveis foram encontrados em frutos provenientes de plantas inoculadas com os demais tratamentos não diferindo entre si (Tabela 4).

Também foi avaliado o teor de ácido ascórbico presente na polpa dos frutos nos dois estádios de maturação (Figura 14). Nos frutos verdes não houve diferença no teor de ácido ascórbico devido à inoculação ou coinoculação das plantas em ambos os genótipos. Contudo, em frutos maduros observa-se que independente do genótipo, frutos provenientes de plantas coinoculadas apresentam menor teor de ácido ascórbico. Nas plantas do genótipo WT verifica-se maior teor de ácido ascórbico em frutos provenientes de plantas inoculadas. Nas plantas do genótipo 8-14, contudo, se observa maior acúmulo de ácido ascórbico em frutos de plantas inoculadas, não diferindo ( $P<0,05$ ) do teor de ácido ascórbico dos frutos das plantas não inoculadas.

Analisou-se, também, a evolução da cor do tomate desde o verde até o vermelho em frutos armazenados sob baixa temperatura e temperatura ambiente (Figura 15). Nos frutos colhidos de plantas do genótipo WT inoculadas com a bactéria e armazenados a 11°C, dentro da faixa mínima de segurança para tomate, verificaram mudanças mais rápidas do ângulo hue, começando ainda no 4º dia de análise (Figura 15). Os frutos de plantas não inoculadas do mesmo genótipo WT apresentaram alterações de cor mais proeminentes só a partir do 6º dia, enquanto nos frutos de plantas dos demais tratamentos se mativeram sem mudança de cor significativa até o 8º dia, quando começaram a mostrar mudanças de cor mais acentuadamente. Valores maiores de ângulo hue foram encontrados em frutos do genótipo 8-14 de plantas não inoculadas, seguido de frutos colhidos de plantas do mesmo genótipo e inoculadas com a bactéria. Ao longo dos 30 dias de análise, os frutos de plantas do genótipo WT e inoculadas com a bactéria apresentaram o menor valor de ângulo hue, com queda acentuada entre o 4º e 12º dia.

Quando armazenados à temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ), os frutos provenientes de plantas não inoculadas apresentaram os menor valor de ângulo hue após 4 dias, em ambos os genótipos. Os frutos de plantas de ambos os genótipos inoculadas mostraram declínio mais pronunciado no ângulo hue somente após o sexto dia. Além disso, frutos de plantas inoculadas do genótipo WT e coinoculadas do genótipo 8-14 apresentaram mudanças mais pronunciadas de cor após o 9º dia e 10º dia, respectivamente.

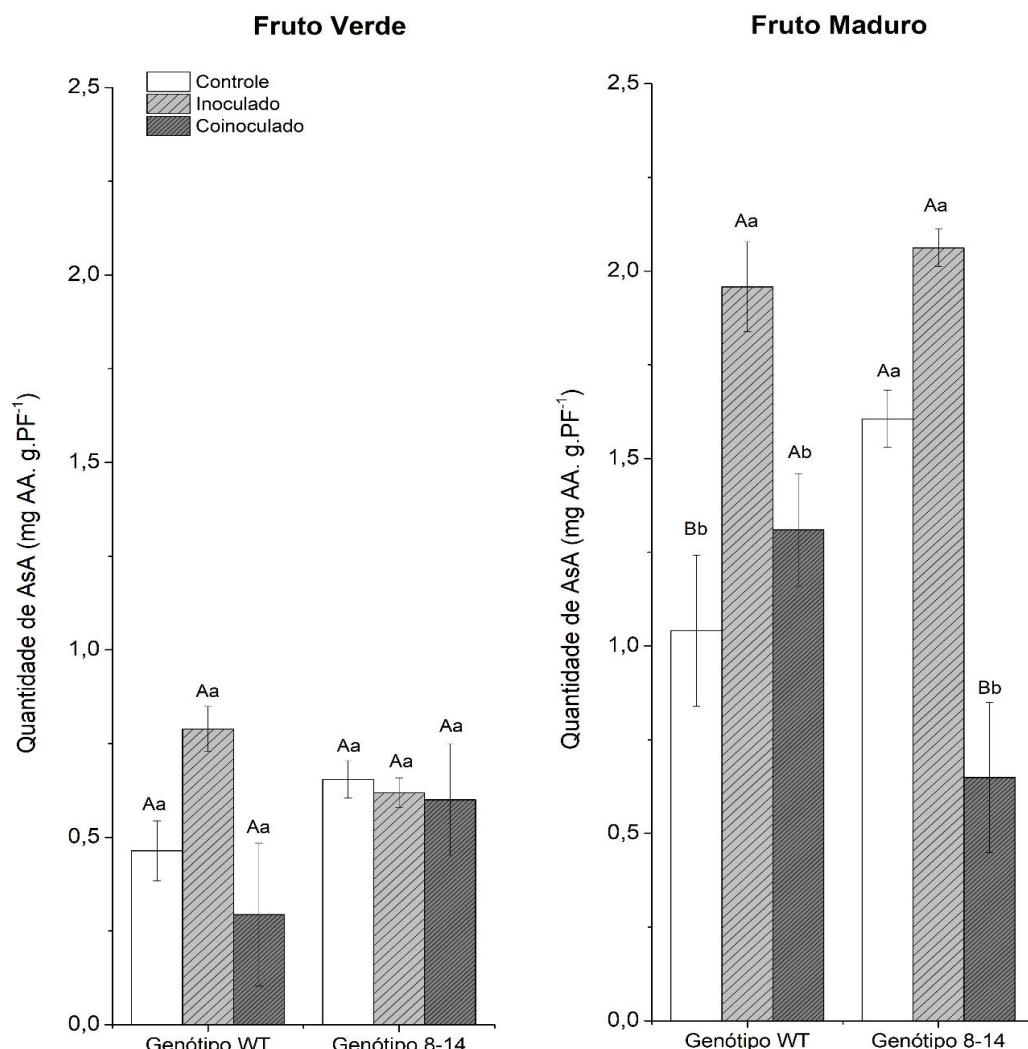


Figura 14: Conteúdo de ácido ascórbico na polpa de frutos verdes e maduros de tomate. As barras brancas representam frutos provenientes de plantas controle, sem inoculação. As barras cinzas com listras diagonais representam frutos vindos de plantas inoculadas com *A. brasiliense*. Barras mais escuras com listras próximas representam frutos provenientes de plantas coinoculadas com *A. brasiliense* e *Trichoderma*. Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Nos mesmos frutos aos quais se avaliou a mudança de cor em temperatura ambiente, avaliou-se, também, a perda de massa fresca dos frutos ao longo do tempo (Figura 16). Os frutos do genótipo 8-14 de plantas coinoculadas apresentaram a menor perda de massa fresca ao longo dos 15 dias de análise, perdendo em média 7% de sua massa, seguido pelos frutos do mesmo genótipo, porém de plantas não inoculadas. os frutos do genótipo WT, em especial provenientes de plantas não inoculadas e inoculadas apenas com a bactéria apresentaram o maior valor de perda de massa fresca (Figura 16).

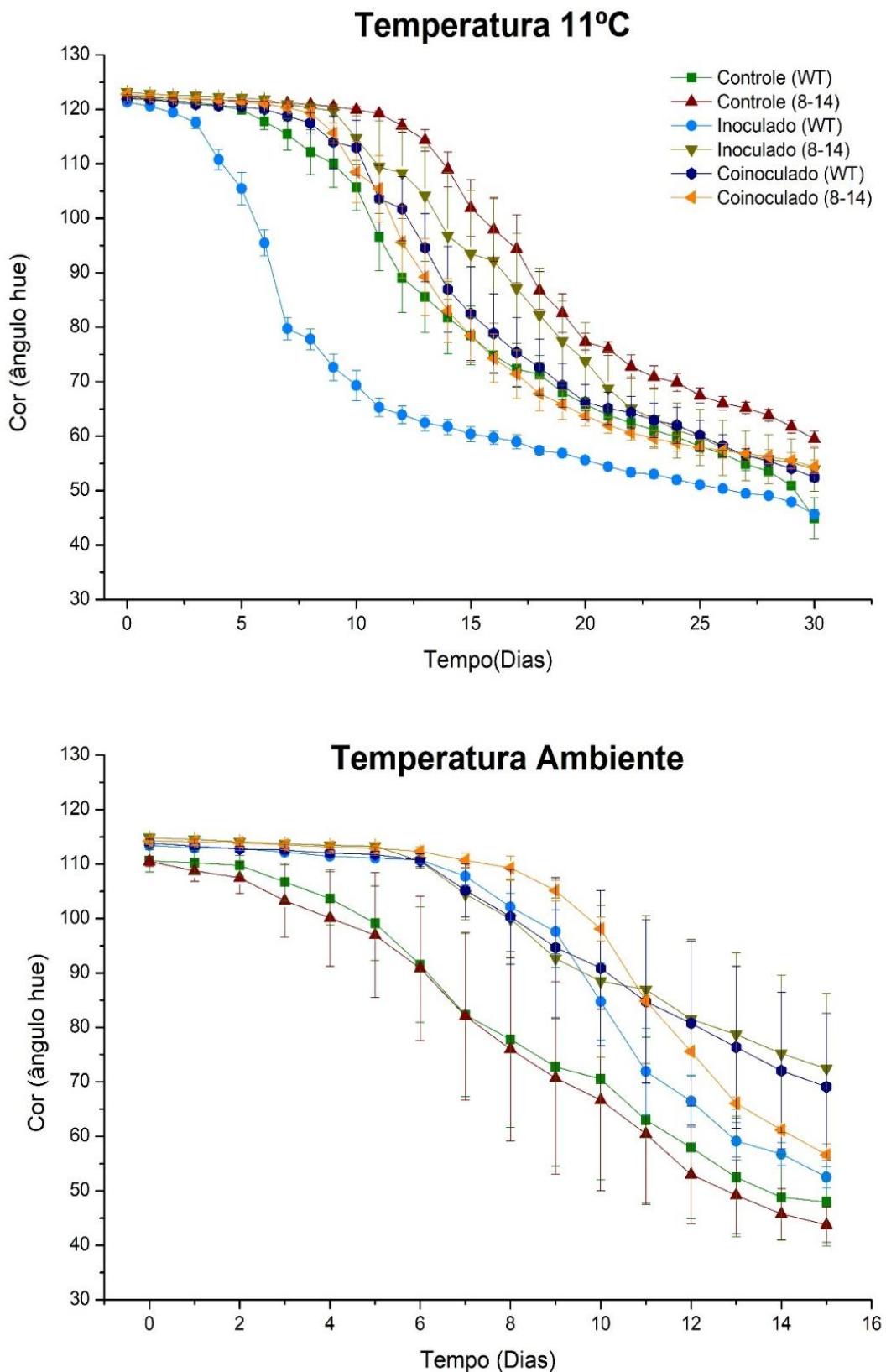


Figura 15: Variação no ângulo hue dos frutos de tomate em função do tempo de armazenamento sob refrigeração a 11°C e temperatura ambiente ( $\geq 25^{\circ}\text{C}$ ).

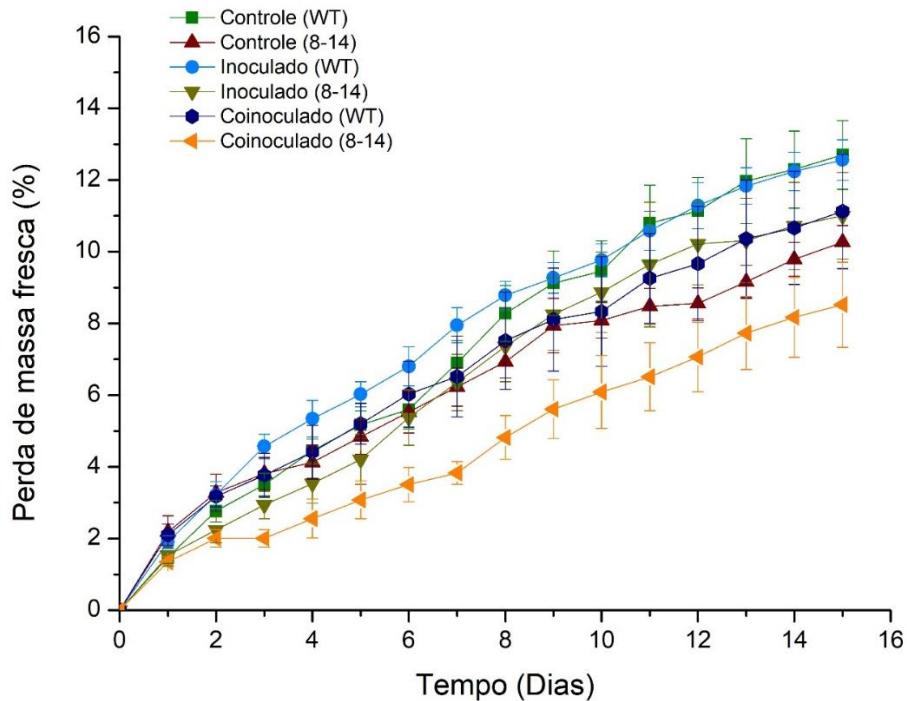


Figura 16: Representação gráfica da perda de massa fresca de frutos verdes de tomate durante o armazenamento à temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ).

### A presença dos micro-organismos promotores do crescimento é capaz de alterar a respiração mitocondrial nos diversos tecidos do tomateiro

Verificando-se o consumo de  $\text{O}_2$  em mitocôndrias isoladas de raiz e utilizando o NADH como substrato durante a respiração, foi possível observar uma maior taxa respiratória total em plantas coinoculadas do genótipo 8-14 com os demais tratamentos não diferindo entre si (Figura 17). A participação maior da COX na respiração total em comparação com a AOX predominou em quase todos os tratamentos, exceto nas raízes das plantas do genótipo 8-14 inoculadas onde a participação da COX e AOX não diferiram ( $P<0,05$ ).

Em mitocôndrias isoladas de folhas do tomateiro do mesmo genótipo WT não houve diferença ( $P<0,05$ ) na respiração total, assim como verificado em mitocôndrias isoladas de folhas do genótipo 8-14, exceto nas plantas coinoculadas que apresentaram menor respiração total (Figura 17). Em geral, a respiração em mitocôndrias isoladas de folha mostra maior participação da COX em comparação a via AOX, com valores em torno de 80% de participação da COX na respiração total.

A respiração em mitocôndrias isoladas de frutos mostra que nos frutos colhidos de plantas coinoculadas apresentaram maior taxa respiratória em comparação aos frutos de plantas inoculadas. A respiração total de frutos de plantas inoculadas e plantas não inoculadas não diferiu entre si ( $P<0,05$ ) em ambos os genótipos (Figura 17). Contudo, nos frutos das plantas do genótipo WT não inoculadas apresentaram maior taxa respiratória total em comparação com aqueles provenientes de plantas do genótipo 8-14 não inoculadas. Em relação à participação da COX e da AOX na respiração o mesmo padrão se manteve com a predominância da participação da COX, que por sua vez não diferiu ( $P<0,05$ ) do valor da respiração total, exceto na respiração dos frutos de plantas do genótipo 8-14 não inoculadas onde a participação da COX e AOX não diferiu entre si.

Com alteração do substrato para L-GalL, precursor da síntese do ácido ascórbico, mudanças foram observadas na respiração (Figura 18). A respiração total nas raízes não variou significativamente entre nenhum dos tratamentos, além disso, a participação da COX e da AOX também não diferiu. Porém, nas mitocôndrias isoladas de folhas do genótipo 8-14 verificou-se maior respiração total nas plantas não inoculadas. Em relação à respiração em mitocôndrias isoladas das folhas das plantas do genótipo WT inoculadas e não inoculadas não variaram ( $P<0,05$ ) entre si. Nesse tecido também é possível perceber uma maior participação da COX em comparação a AOX em todos os tratamentos. Para os frutos maduros de tomate do genótipo WT, ao contrário, é possível verificar mudanças na respiração total, sendo que frutos provenientes de plantas inoculadas apresentaram uma menor taxa respiratória total. Enquanto que nas plantas não inoculadas e coinoculadas a respiração em mitocôndrias isoladas dos frutos foi 1,5 vezes maior do que dos frutos de plantas inoculadas.

Considerando a participação da AOX e COX nesses tratamentos é possível perceber uma menor participação da AOX em comparação com a COX nas mitocôndrias de plantas não inoculadas e inoculadas, porém, em frutos de plantas coinoculadas a participação de COX e AOX não diferiram entre si ( $P<0,05$ ). Frutos do genótipo 8-14, a respiração total não diferiu entre plantas não inoculadas ou inoculadas apenas com a bactéria ou coinoculadas com o fungo, porém, em frutos de plantas inoculadas houve uma clara diferença na participação das oxidases terminais, com a AOX novamente apresentando menor

participação na respiração total. Em frutos do controle e de plantas coinoculadas a participação da COX e AOX não diferiu entre si novamente.

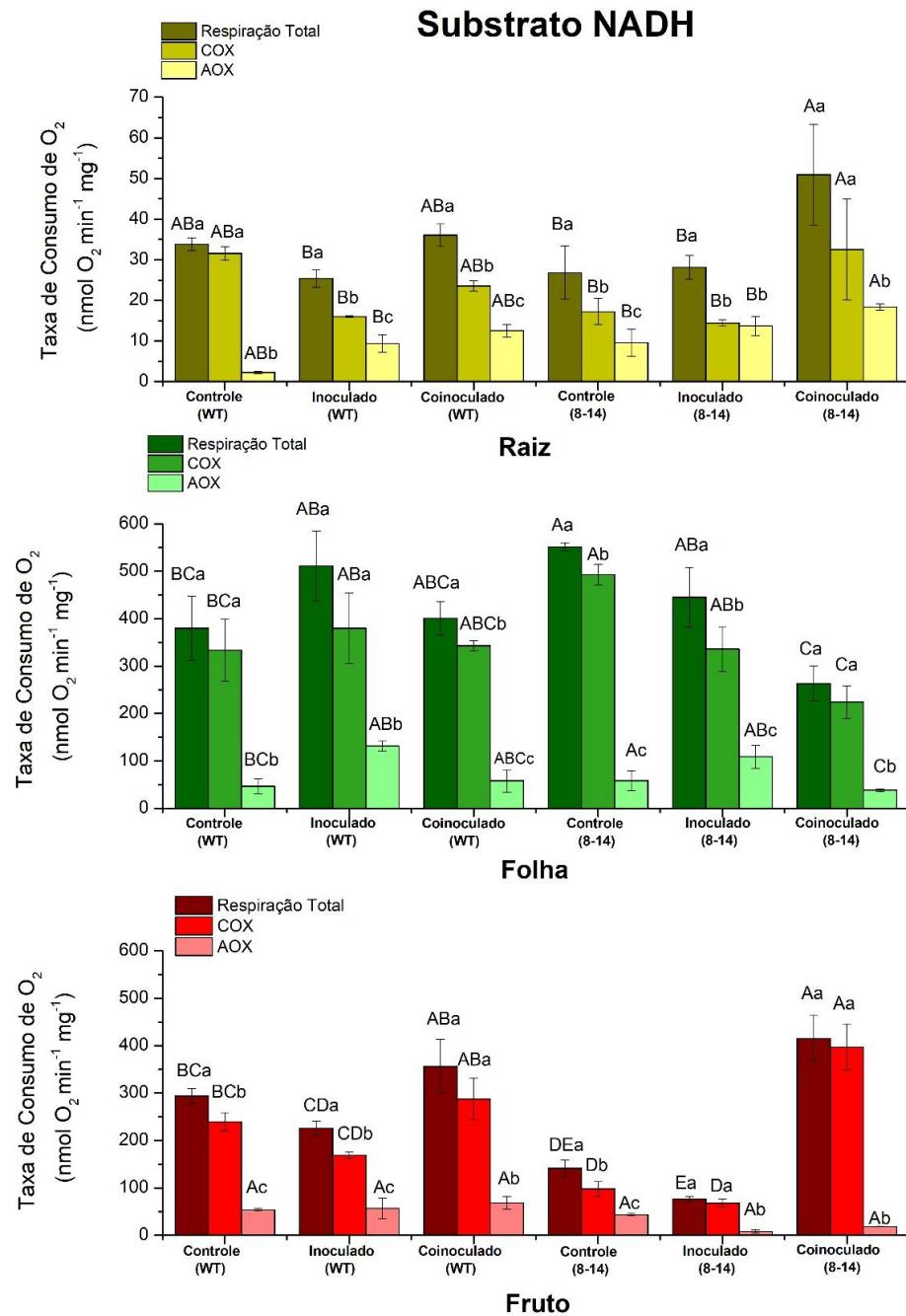


Figura 17: Taxa de consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas de raiz, folha e fruto maduro de tomate utilizando-se como substrato o NADH. Barras mais escuras representam a respiração total, barras mais claras a participação da AOX e barras em cores medianas a participação da COX dentro da respiração. Em amarelo é representado o consumo de oxigênio das mitocôndrias de raiz, em verde as mitocôndrias de folha e em vermelho as mitocôndrias de fruto maduro de tomate. Letras maiúsculas comparam entre os tratamentos e letras minúsculas dentro de cada tratamento. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais.

\*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

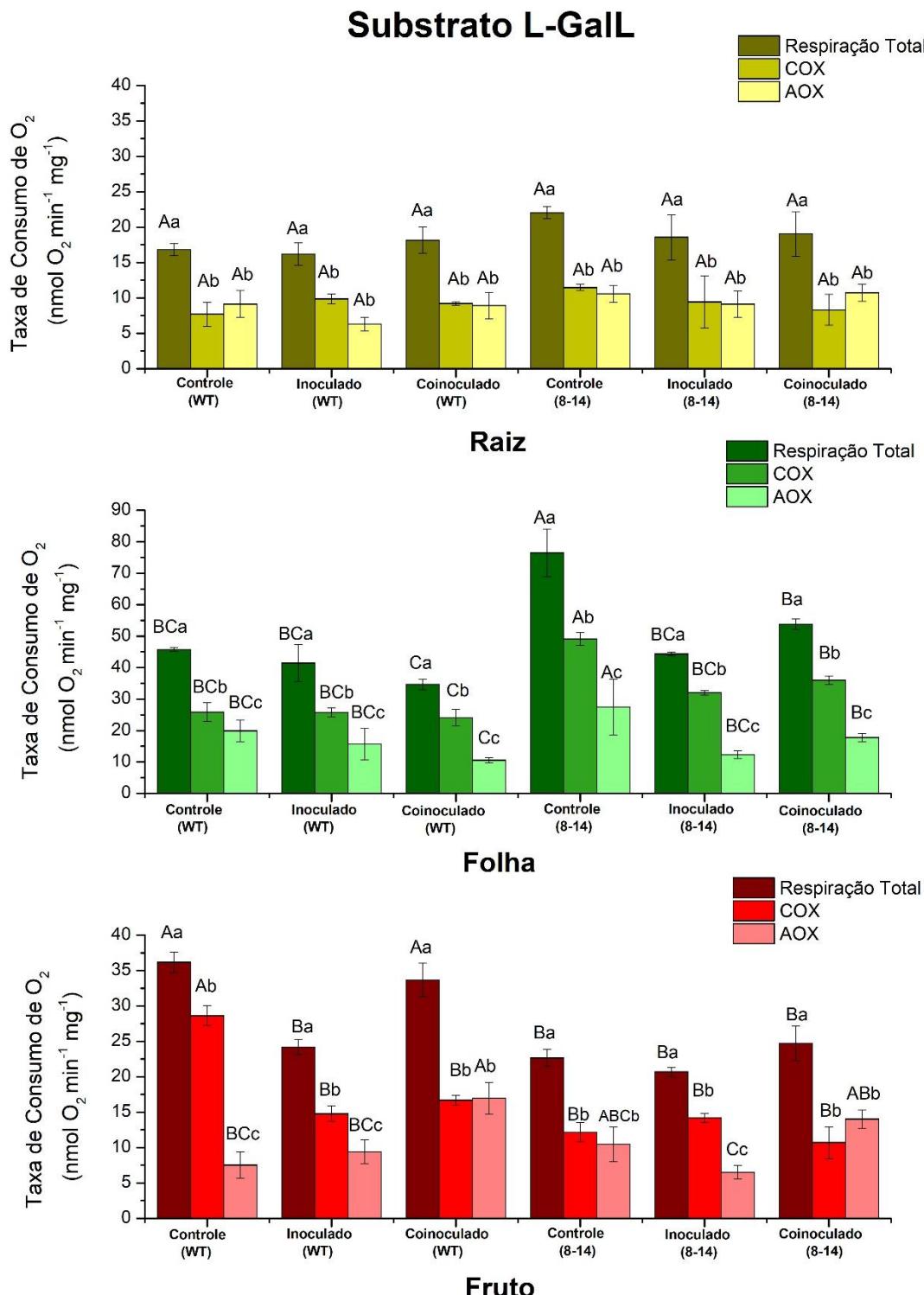


Figura 18: Taxa de consumo de O<sub>2</sub> em mitocôndrias isoladas de raiz, folha e fruto maduro de tomate utilizando-se como substrato o L-GaL. Barras mais escuras representam a respiração total, barras mais claras a participação da AOX e barras em cores medianas a participação da COX dentro da respiração. Em amarelo é representado o consumo de oxigênio das mitocôndrias de raiz, em verde as mitocôndrias de folha e em vermelho as mitocôndrias de fruto maduro de tomate. Letras maiúsculas comparam entre os tratamentos e letras minúsculas dentro de cada tratamento. Letras diferentes

representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Em sua maioria, nos tecidos analisados houve a prevalência da participação da COX na respiração total de modo que em tratamentos inoculados a ação da bactéria na respiração não influenciou muito. De modo a investigar mais as oxidases terminais da mitocôndria e seu papel na respiração, foi observada a porcentagem de participação relativa de cada oxidase nos diferentes tratamentos, genótipos e substratos, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Em raiz, a participação da COX no genótipo WT em comparação ao 8-14 é 1,4 vezes maior. Além disso, em ambos os genótipos a inoculação e coinoculação diminuiram a participação da COX em 1,4 vezes no genótipo WT e 1,2 vezes no genótipo 8-14. Em oposição, a inoculação e coinoculação aumentou a participação da AOX na respiração total. No genótipo WT, esse aumento correspondeu a 6 vezes mais do que o tratamento controle. No genótipo 8-14 o aumento foi de 1,4 vezes. Ainda em raiz, na presença de L-GalL a participação relativa de COX e AOX não foi alterada devido à inoculação ou ao genótipo da planta. Entretanto, percebe-se que na presença desse substrato a participação da COX e AOX nesse tecido é aproximadamente a mesma.

Nas mitocôndrias isoladas de folha, a COX na presença de NADH também foi reduzida devido à inoculação com a bactéria com o tratamento coinoculado não diferindo estatisticamente do controle. Consequentemente, a AOX apresentou maior participação relativa na respiração de folhas de plantas inoculadas. Na presença de L-GalL não foi possível observar diferenças estatísticas na participação de COX e AOX. Todavia, ainda é importante perceber que nesse tecido a participação da COX gira em torno de 60% com a AOX presente em 40% da respiração total na presença de L-GalL. Em comparação, na presença de NADH, a participação relativa da COX gira em torno de 80%.

Em frutos, a COX também prevalece na respiração total com participação média de 80% na presença de NADH. A presença da bactéria, contudo, mostrou resultados diferentes a depender do genótipo do tomate nessas condições. Para o genótipo WT, não houve diferença entre os tratamentos para COX e AOX. Enquanto que, no genótipo 8-14, frutos de plantas inoculadas apresentaram maior participação da COX em torno de 1,3 vezes maior e em frutos de plantas

inoculadas esse aumento foi de 1,4 vezes maior com a mesma sendo responsável por 95% da respiração total. Em contrapartida, a AOX de frutos controle foi maior no genótipo mutante. Observando, apenas os frutos de plantas não inoculadas, ainda na presença de NADH, percebe-se que frutos do genótipo WT apresentam uma maior participação relativa da COX (80%), enquanto que os frutos do genótipo 8-14 em comparação apresentam maior participação de AOX comparado ao controle (31%). Nas mitocôndrias de frutos na presença de L-GaIL, para a COX o tratamento controle e inoculado não diferiram entre si em ambos os genótipos, contudo, apresentaram valores maiores em comparação ao tratamento coinoculado. Novamente, percebe-se que o genótipo WT tem uma maior participação da COX nos frutos maduros de tomate (80%), em comparação ao genótipo 8-14 (55%). Considerando a respiração com L-GaIL e a AOX, houve uma diferença em relação ao efeito da bactéria nos diferentes genótipos. No genótipo WT, o tratamento controle e inoculado não diferiram estatisticamente entre si, porém, na comparação entre frutos de plantas controle e coinoculadas houve um aumento de 2,5 vezes mais participação dessa oxidase. O genótipo 8-14, também não apresentou diferenças entre o tratamento controle e os demais. Observando, contudo, os tratamentos inoculados e coinoculados, os mesmos diferiram entre si com valores 1,8 vezes maiores no tratamento coinoculado.

Tabela 5: Participação relativa das oxidases COX e AOX (%) na respiração total de mitocôndrias isoladas de raiz, folha e fruto de tomate na presença dos substratos, L-GaIL e NADH

Raiz Tratamento	Substrato			
	NADH		L-GaIL	
	COX (%)	AOX (%)	COX (%)	AOX (%)
<b>Controle (WT)</b>	93,25 ± 1,09 Aa	6,74 ± 1,09 Bb	46,03 ± 10,65 Aa	53,96 ± 10,65 Aa
<b>Inoculado (WT)</b>	63,91 ± 5,85 Ab	36,08 ± 5,85 Ba	61,37 ± 2,28 Aa	38,62 ± 2,28 Aa
<b>Coinoculado (WT)</b>	65,43 ± 1,89 Ab	34,56 ± 1,89 Ba	51,86 ± 5,82 Aa	48,13 ± 5,82 Aa
<b>Controle (8-14)</b>	66,77 ± 5,18 Ba	33,22 ± 5,18 Ab	52,27 ± 3,65 Aa	47,72 ± 3,65 Aa
<b>Inoculado (8-14)</b>	51,95 ± 3,58 Bb	48,04 ± 3,58 Aa	48,38 ± 6,27 Aa	51,61 ± 11,25 Aa
<b>Coinoculado (8-14)</b>	59,80 ± 8,38 Bb	40,19 ± 8,38 Aa	42,48 ± 5,08 Aa	57,51 ± 5,08 Aa

Folha Tratamentos	Substrato			
	NADH		L-GaIL	
	COX (%)	AOX (%)	COX (%)	AOX (%)
<b>Controle (WT)</b>	87,62 ± 4,25 Aa	12,37 ± 4,25 Ab	56,69 ± 7,02 Aa	43,30 ± 7,02 Aa
<b>Inoculado (WT)</b>	73,00 ± 5,16 Ab	26,99 ± 5,16 Aa	64,15 ± 7,07 Aa	35,84 ± 7,07 Aa
<b>Coinoculado (WT)</b>	86,33 ± 4,51 Aa	13,66 ± 4,51 Ab	69,18 ± 3,82 Aa	30,81 ± 3,82 Aa
<b>Controle (8-14)</b>	89,42 ± 3,79 Aa	10,57 ± 3,79 Ab	65,85 ± 8,09 Aa	34,14 ± 8,09 Aa
<b>Inoculado (8-14)</b>	75,58 ± 3,44 Ab	24,41 ± 3,44 Aa	72,21 ± 2,47 Aa	27,78 ± 2,47 Aa
<b>Coinoculado (8-14)</b>	85,06 ± 1,09 Aa	14,93 ± 1,09 Ab	66,99 ± 2,07 Aa	33,00 ± 2,07 Aa

Fruto Maduro Tratamento	Substrato			
	NADH		L-GaIL	
	COX (%)	AOX (%)	COX (%)	AOX (%)
<b>Controle (WT)</b>	81,45 ± 1,81 Aa	18,54 ± 1,81 Ba	79,40 ± 4,86 Aa	20,59 ± 4,86 Bb
<b>Inoculado (WT)</b>	75,87 ± 8,17 Ba	24,12 ± 8,17 Aa	61,40 ± 5,95 Aab	38,59 ± 5,95 Aab
<b>Coinoculado (WT)</b>	80,91 ± 0,56 Ba	19,08 ± 0,56 Aa	50,07 ± 3,55 Ab	49,92 ± 3,55 Aa
<b>Controle (8-14)</b>	68,63 ± 2,72 Bb	31,36 ± 2,72 Aa	54,60 ± 8,46 Bab	45,39 ± 8,46 Aab
<b>Inoculado (8-14)</b>	88,57 ± 4,78 Aa	11,42 ± 4,78 Bb	68,73 ± 4,00 Aa	31,26 ± 4,00 Ab
<b>Coinoculado (8-14)</b>	95,52 ± 0,36 Aa	4,47 ± 0,36 Bb	42,63 ± 6,00 Ab	57,36 ± 6,00 Aa

Letras maiúsculas representam a comparação entre os genótipos para cada tratamento, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre os tratamentos para o mesmo genótipo. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

**A bactéria *A. brasiliense* ABV5 afeta a atividade da L-GaILDH nos diferentes tecidos vegetais em presença de estimulantes e inibidores da AOX**

A atividade da L-GaILDH em tecidos de raiz foi 3 vezes maior no tratamento controle para o genótipo WT comparado ao tratamento inoculado, não diferindo estatisticamente no tratamento inoculado (Figura 19). Para os tratamentos do genótipo WT não houve diferença na atividade em condições controle da enzima. Com a utilização de piruvato, estimulante da atividade AOX os resultados foram inesperados. No tratamento controle e coinoculado do genótipo WT houve uma diminuição da atividade da enzima, enquanto que no tratamento coinoculado sua atividade não diferiu estatisticamente do controle enzimático. Ao se utilizar o inibidor da AOX nPG, não houve alterações significativas na atividade da enzima. Porém, ao empregar o inibidor SHAM, o mesmo diminuiu significativamente a atividade da mesma nos tratamentos de plantas controle e coinoculadas. Ainda em tecidos de raiz, Apesar de não haver diferença estatística da atividade da enzima, no tratamento de plantas inoculadas em situação controle a L-GaILDH foi completamente inibida. Em relação à presença de estimuladores e inibidores da AOX não houve diferença estatística na maioria dos tratamentos, com exceção de plantas controle que com a utilização de nPG também levou a uma inibição completa da atividade da enzima de modo que a mesma seja diferente da utilização de piruvato.

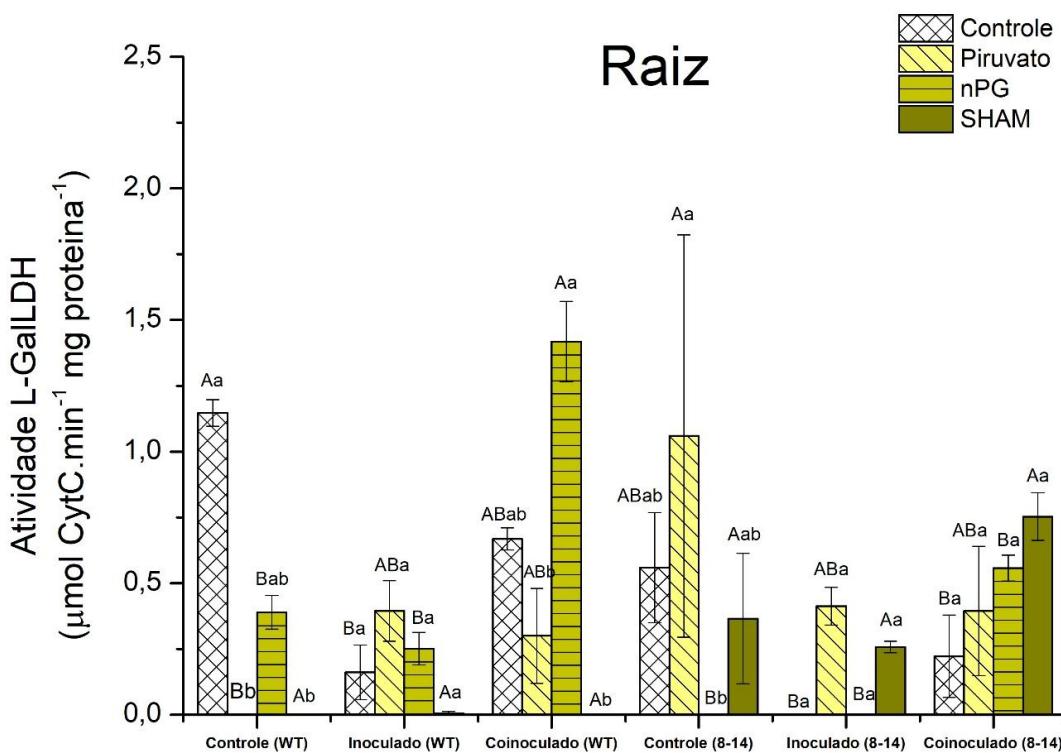


Figura 19: Atividade da enzima L-GaL LDH em mitocôndrias isoladas de tecido de raiz de plantas de tomate. Barras brancas quadriculadas representam a atividade da enzima sem a utilização de substratos e inibidores da CTEm. Barras com listras diagonais representam a atividade da enzima na presença de piruvato, estimulador da AOX. Barra com listras horizontais representam atividade da enzima na presença de nPG, inibidor da AOX. Barras sem marcação representam a atividade da enzima na presença de SHAM, outro inibidor da AOX. Letras maiúsculas representam a comparação entre cada tratamento da mesma variável, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre as variáveis de um mesmo tratamento. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

No tecido foliar a resposta à presença de bactéria foi diferente (Figura 20). Em tratamentos de plantas inoculadas, foi encontrada uma atividade da L-GaL LDH em comparação ao controle. Em plantas do genótipo 8-14, a atividade da enzima não diferiu estatisticamente de plantas controle e inoculadas. Porém, no genótipo 8-14, a coinoculação da planta rendeu uma maior atividade da enzima, sendo 6 vezes maior em comparação com controle e 0,5 vezes maior em comparação às plantas inoculadas. Em relação à utilização de inibidores e estimuladores da AOX, na maioria dos tratamentos não houve alteração em comparação à atividade controle. Porém, em plantas controle do genótipo WT, a utilização de SHAM estimulou a atividade da enzima em comparação ao controle. Inversamente, a utilização de SHAM e n-PG por sua vez em plantas inoculadas

do genótipo WT levou a uma inibição da atividade da enzima. Plantas do genótipo 8-14 sem inoculação apresentaram valores elevados de L-GaILDH em tratamentos com piruvato e foram completamente inibidas na presença de nPG apesar de não haver diferença estatística em comparação com a atividade controle. Enquanto que, em plantas coinoculadas do mesmo genótipo, a atividade controle da enzima foi maior em todas as situações.

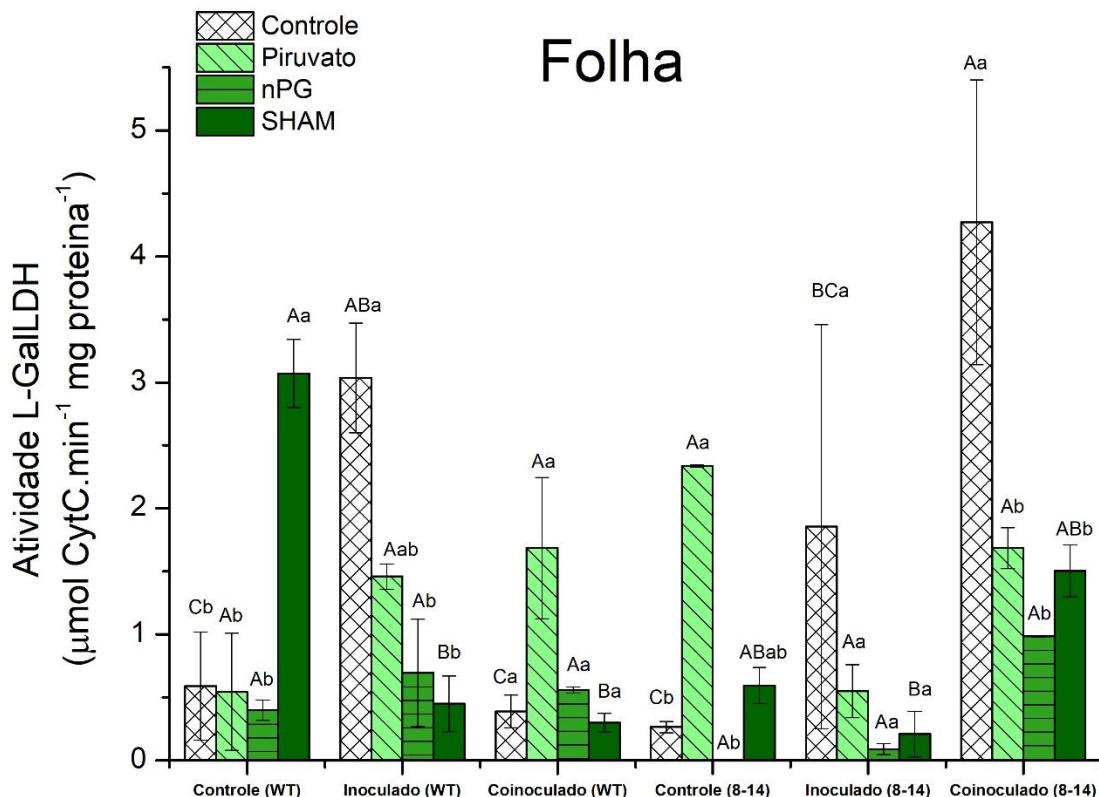


Figura 20: Atividade da enzima L-GaILDH em mitocôndrias isoladas de tecido foliar de plantas de tomate. Barras brancas quadriculadas representam a atividade da enzima sem a utilização de substratos e inibidores da CTEm. Barras lilás com listras diagonais representam a atividade da enzima na presença de piruvato, estimulador da AOX. Barras roxas com listras verticais representam atividade da enzima na presença de nPG, inibidor da AOX. Barras roxas escuras sem marcação representam a atividade da enzima na presença de SHAM, outro inibidor da AOX. Letras maiúsculas representam a comparação entre cada tratamento da mesma variável, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre as variáveis de um mesmo tratamento. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Em frutos maduros de tomate, também houve uma variação devido à presença de bactéria nas plantas (Figura 21). A atividade da L-GaILDH foi maior no controle de plantas WT em comparação aos frutos de plantas coinoculadas onde houve uma atividade 6 vezes menor, sendo ainda que frutos de plantas

controle e inoculadas não variaram entre si. Nos tratamentos de plantas do genótipo 8-14, frutos de plantas controle e de plantas inoculadas apresentaram o mesmo valor de atividade enzimática, não diferindo também de frutos de plantas co-inoculadas. Porém, a atividade de frutos de plantas controle do genótipo WT tiveram maior atividade do que de frutos do genótipo 8-14 nas mesmas condições.

Considerando frutos de plantas controle do genótipo WT, apenas a utilização de nPG causou uma inibição da atividade da L-GalLDH em ordem 10 vezes menor de atividade. Nos frutos de plantas inoculadas no mesmo genótipo, a utilização de piruvato estimulou a atividade da enzima 1,75 vezes mais, enquanto que na presença de nPG a mesma foi completamente inibida. Frutos de plantas coinoculadas do genótipo em questão não alteraram significativamente a sua atividade enzimática apesar de novamente a presença de nPG causar a completa inibição da atividade da enzima. Um padrão parecido aconteceu no genótipo 8-14 para frutos de plantas controle e coinoculadas não diferindo estatisticamente entre si, apesar de plantas controle a na presença de ambos os inibidores da AOX, SHAM e nPG, não haver atividade da L-GalLDH. Em frutos de plantas coinoculadas desse genótipo, a presença de SHAM levou a uma atividade média 2,5 vezes maior do que o controle. Além disso, a presença de piruvato e nPG, ao contrário, causou uma inibição na atividade da L-GalLDH.

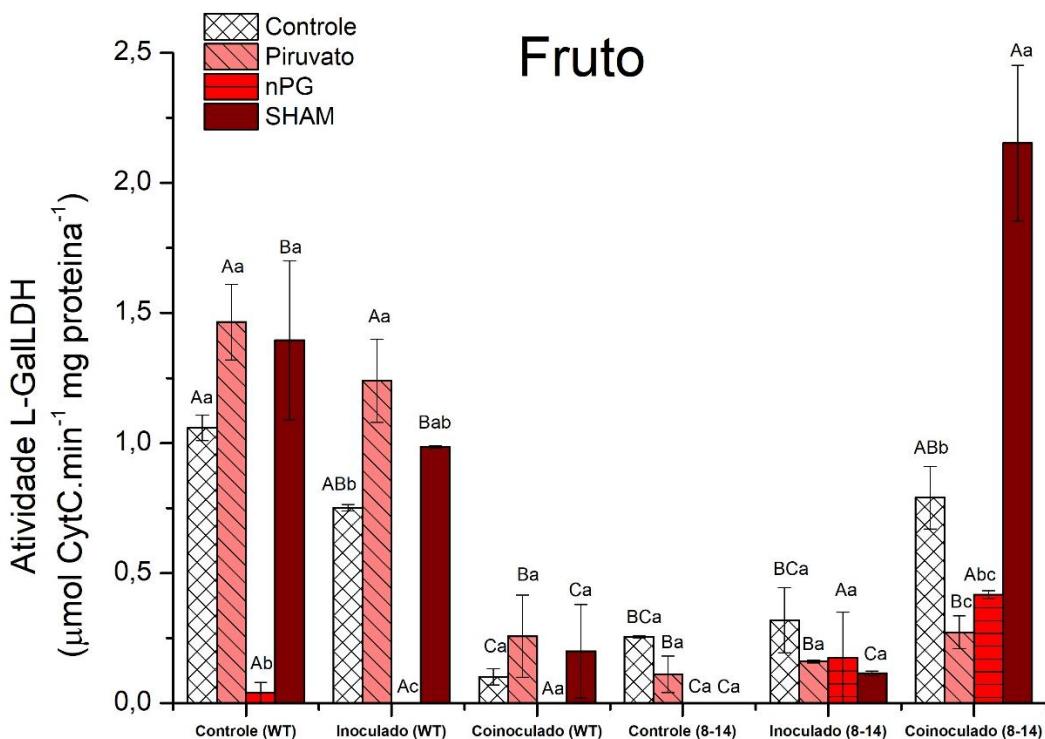


Figura 21: Atividade da enzima L-GaLDH em mitocôndrias isoladas de frutos maduros. Barras brancas quadriculadas representam a atividade da enzima sem a utilização de substratos e inibidores da CTEm. Barras lilás com listras diagonais representam a atividade da enzima na presença de piruvato, estimulador da AOX. Barras roxas com listras verticais representam atividade da enzima na presença de nPG, inibidor da AOX. Barras roxas escuras sem marcação representam a atividade da enzima na presença de SHAM, outro inibidor da AOX. Letras maiúsculas representam a comparação entre cada tratamento da mesma variável, enquanto letras minúsculas representam a comparação entre as variáveis de um mesmo tratamento. Letras diferentes representam significância estatística e mesma letra valores significativamente iguais. \*ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

**Genes relacionados a respiração mitocondrial e metabolismo do ácido ascórbico são influenciados pela presença de *A. brasiliense* ABV5 e *T. longibrachiatum* T476 na planta, bem como a subexpressão da L-GaLDH em plantas de tomate**

A ubiquinona presente na CTEm é responsável por receber elétrons de diferentes complexos da cadeia transportadora apresentou uma expressão gênica variável nos diferentes tecidos analisados, bem como foi influenciada pela mutação do tomate. Em raiz, plantas do genótipo 8-14 expressam significativa 2,5 vezes maior do que em plantas do genótipo WT (Figura 22). Considerando a inoculação por outro lado, no genótipo 8-14 a presença de bactéria levou a uma subexpressão do gene 5 vezes menor em plantas inoculadas e coinoculadas.

Esse mesmo padrão se repetiu em raízes de plantas inoculadas do genótipo WT (Tabela Suplementar 3). Contudo, em tecido foliar, o resultado foi inverso. A expressão relativa do gene da ubiquinona em folhas do genótipo 8-14 é 2,5 vezes menor do que em folhas presentes no genótipo WT. Considerando a presença de bactéria na planta, no genótipo WT, o tratamento coinoculado apresentou uma expressão do gene 20 vezes maior que o controle. Enquanto que no genótipo 8-14, houve uma subexpressão do gene, apresentando valores 0,5 vezes menor do que o controle. Os frutos também se diferiram quanto à expressão do gene da ubiquinona em comparação ao demais tecidos. Primeiramente, não houve diferença entre a expressão gênica de fruto WT e 8-14. No entanto, a inoculação por sua vez causou uma subexpressão desse gene em ambos os genótipos. No genótipo WT, a expressão do gen foi 1,6 vezes menor em frutos de plantas inoculadas e 1,1 vezes menor em frutos de plantas coinoculadas. No genótipo 8-14, contudo, essa subexpressão foi 5 vezes menor em comparação ao controle para ambos os tratamentos.

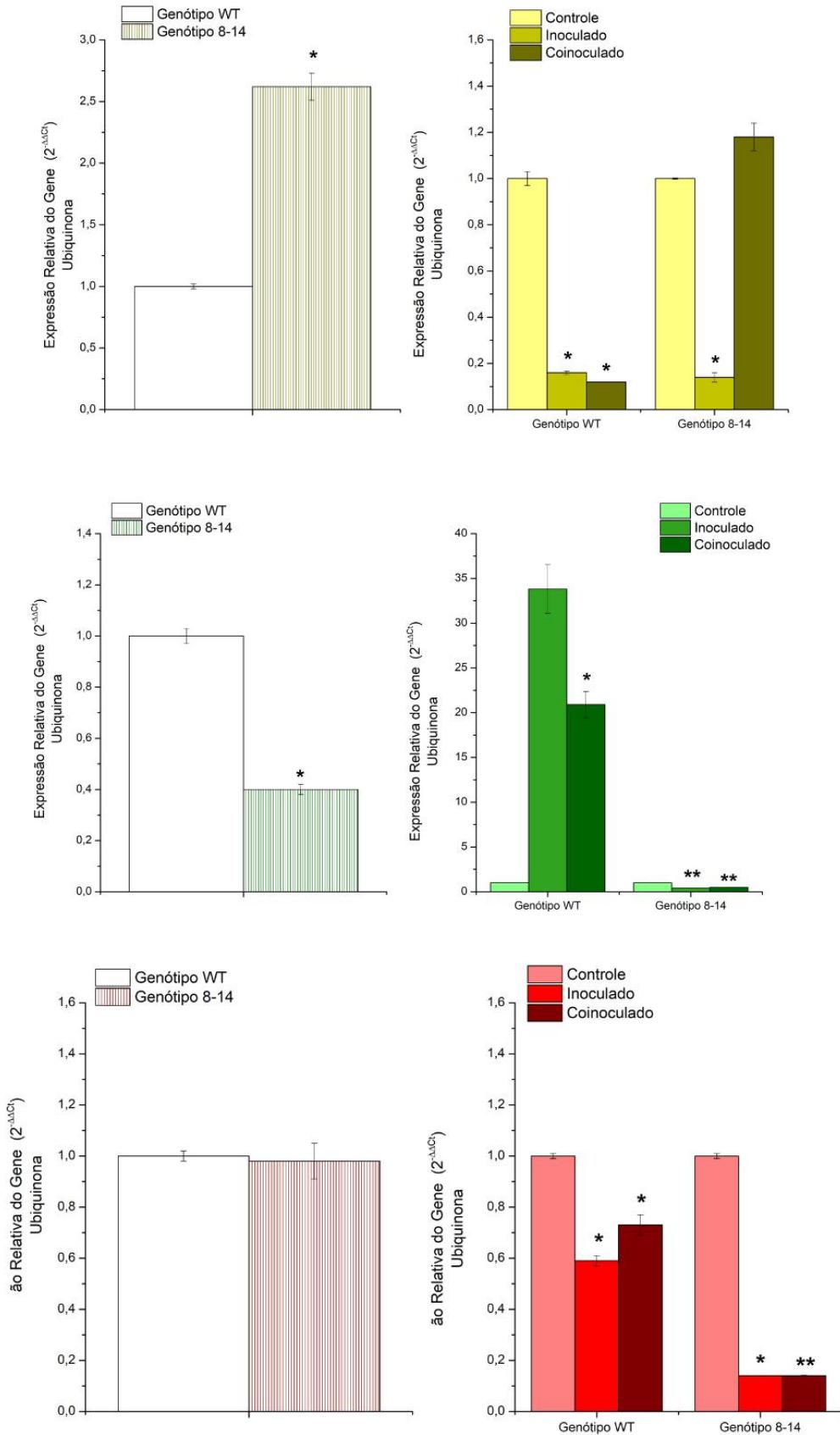


Figura 22: Expressão relativa do gene da ubiquinona em raízes, folhas e frutos de tomate. À esquerda, comparação da expressão gênica em plantas controle do genótipo WT (barra branca) e plantas controle do genótipo 8-14 (barra estriada). À direita está a

comparação da expressão gênica em plantas controle (barra clara), inoculadas (barra mediana) e coinoculadas (barra escuro) do mesmo genótipo. \*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). \*\*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ). \*\*\*: representam valores muito significativos quanto ao teste t de Student em 0,1% de probabilidade ( $p<0,001$ ).

Ainda na expressão gênica de componentes de CTEm, foram analisados os quatro genes relacionados à oxidase terminal AOX nos diferentes tecidos (Figuras 23, 23 e 24). Em raízes, para o genótipo AOX 1a, o mesmo teve uma subexpressão 96% menor no genótipo 8-14 (Figura 22). Considerando a presença da bactéria, no genótipo WT houve uma subexpressão em ordem de 70% em plantas inoculadas apesar do valor não ser significativo estatisticamente ( $p=0,05$ ), e em ordem de 90% em plantas coinoculadas ( $p = 0,051$ ) (Tabela Suplementar 2). Para o genótipo 8-14, plantas inoculadas apresentaram uma subexpressão do gene em ordem de 91%.

O gene da AOX1b por sua vez, foi 2,5 vezes maior em raízes do genótipo 8-14 em comparação ao WT. No genótipo WT, os tratamentos inoculados e coinoculados causaram a subexpressão do gene de 50 vezes em plantas inoculadas e 330 vezes em plantas coinoculadas. No genótipo 8-14, o tratamento coinoculado promoveu uma expressão 5 vezes maior do gene da AOX1b. O gene da AOX1c em raiz apresentou mais dados significativos. O genótipo 8-14 apresenta uma maior expressão do gene 4 vezes mais que o genótipo WT. Devido à inoculação, no genótipo WT houve a subexpressão do gene, com plantas inoculadas apresentando 6 vezes menor que o controle e o coinoculado 20 vezes menor. Para o genótipo 8-14, apenas o tratamento coinoculado apresentou valores significativos com uma expressão 4,8 vezes maior que o controle. Por fim, o gene da AOX2 não apresentou valores diferentes quanto aos genótipos nas raízes, e apenas valores significativos em tratamento coinoculado em plantas 8-14, havendo 70% da subexpressão do gene.

Em folha, contudo, o genótipo 8-14 apresenta uma superexpressão do gene de 300 vezes mais para AOX1a (Figura 23). Na presença da bactéria, contudo, apenas plantas inoculadas apresentaram valores significativos, mas padrões opostos. No genótipo WT houve uma superexpressão do gene com valores 35 vezes maiores em comparação com o controle. No genótipo 8-14, a bactéria *A. brasiliense* levou a uma subexpressão do gene em aproximadamente 65%. Para o gene AOX1b, em folhas existe uma menor expressão no genótipo 8-

14, em ordem de 5 vezes em comparação ao controle. Nos tratamentos com a bactéria, porém, apenas o genótipo 8-14 apresentou valores significativos com uma superexpressão de 0,3 vezes para plantas coinoculadas. O gene da AOX1c segue o mesmo padrão em folhas quanto ao genótipo com uma subexpressão de 90% no genótipo 8-14. Em relação aos tratamentos, no genótipo WT apenas plantas inoculadas apresentaram valores significativos com uma subexpressão de 40%. No genótipo 8-14 a presença de bactéria causou respostas opostas com uma subexpressão de 40% em plantas inoculadas e uma superexpressão média de 30% em plantas coinoculadas. O gene da AOX2, novamente não houve diferenciação entre os genótipos Wt e 8-14, sendo que apenas plantas inoculadas do genótipo WT apresentaram valores significativamente menores, indicando uma subexpressão do gene em 40%, apesar de nos outros tratamentos haver a tendência à subexpressão, nenhum dos valores foi significativo.

Em frutos maduros de tomate, apenas o genótipo AOX1a variou quanto ao genótipo e tratamentos (Figura 24). O genótipo 8-14 apresentando uma subexpressão de 60% no gene em comparação ao controle. Frutos do genótipo WT apresentaram variabilidade devido à presença de bactéria com uma subexpressão em frutos provenientes de plantas inoculadas e coinoculadas em ordem de 30% e 50%, respectivamente.

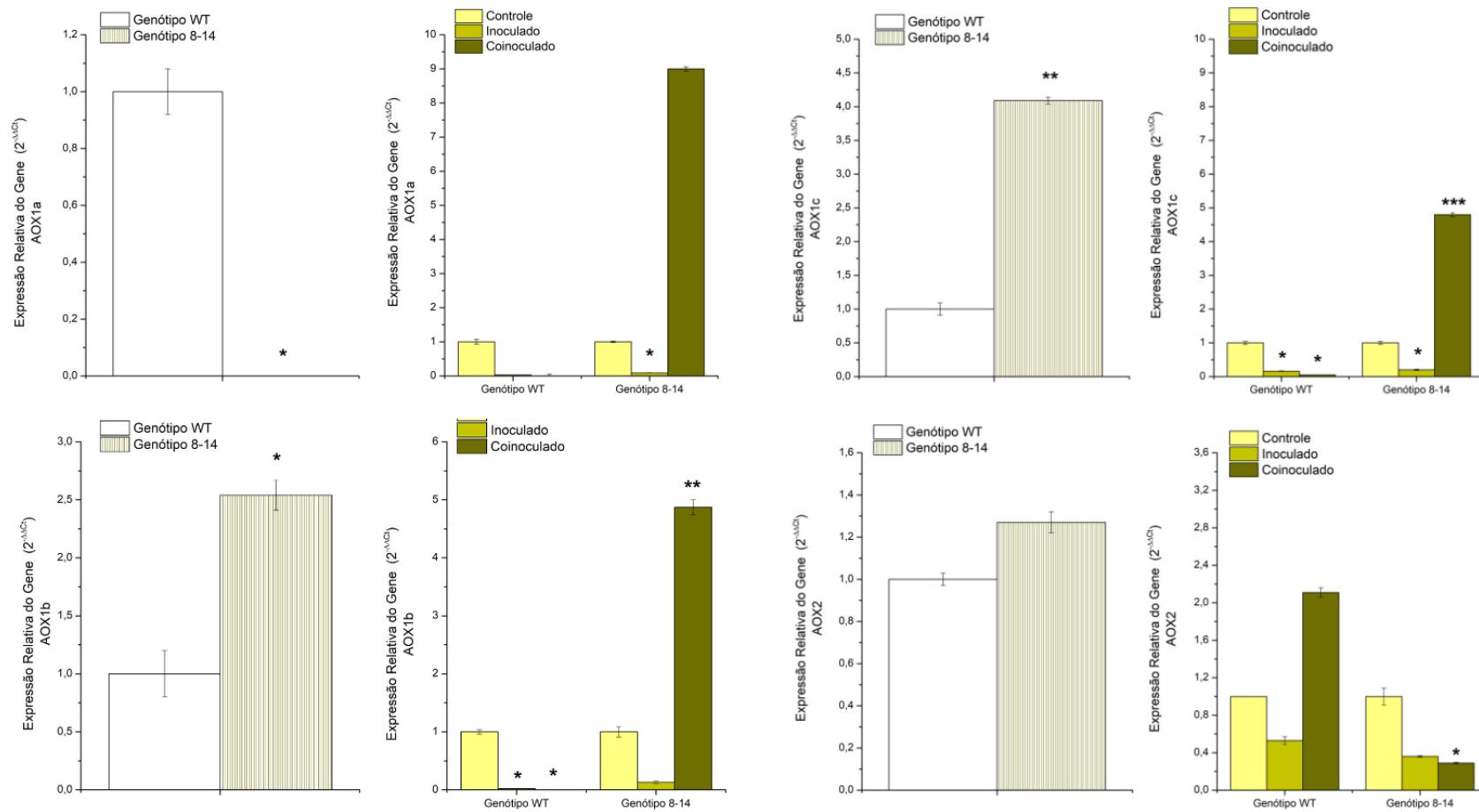


Figura 22: Expressão relativa dos genes relacionados a AOX em raízes de tomate. À esquerda, comparação da expressão gênica em plantas controle do genótipo WT (barra branca) e plantas controle do genótipo 8-14 (barra estriada). À direita está a comparação da expressão gênica em plantas controle (barra mostarda), inoculadas (barra amarelo-escuro) e coinoculadas (barra vinho) do mesmo genótipo. Na primeira coluna de gráficos representa dados do gene da AOX1a em cima e embaixo da AOX1b. Na segunda coluna de gráficos representa dados do gene da AOX1c em cima e embaixo da AOX2 \*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). \*\*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ). \*\*\*: representam valores muito significativos quanto ao teste t de Student em 0,1% de probabilidade ( $p<0,001$ ).

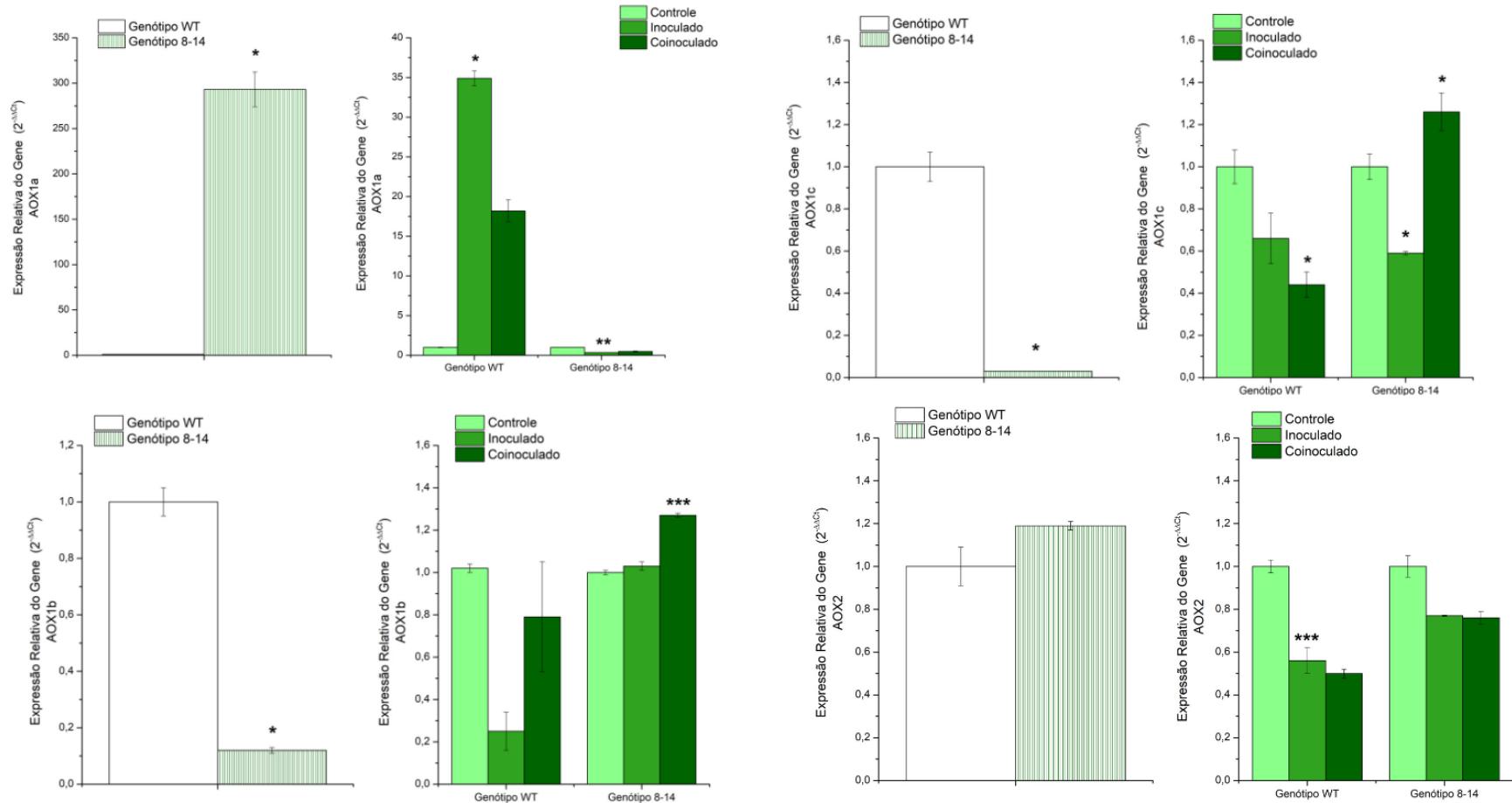


Figura 23: Expressão relativa dos genes relacionados a AOX em folhas de tomate. À esquerda, comparação da expressão gênica em plantas controle do genótipo WT (barra branca) e plantas controle do genótipo 8-14 (barra estriada). À direita está a comparação da expressão gênica em plantas controle (barra verde-claro), inoculadas (barra verde folha) e coinoculadas (barra verde-escuro) do mesmo genótipo. Na primeira linha representam dados do gene da AOX1a, na segunda linha da AOX1b, a terceira linha a expressão da AOX1c e na quarta linha da AOX2. \*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). \*\*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ). \*\*\*: representam valores muito significativos quanto ao teste t de Student em 0,1% de probabilidade ( $p<0,001$ ).

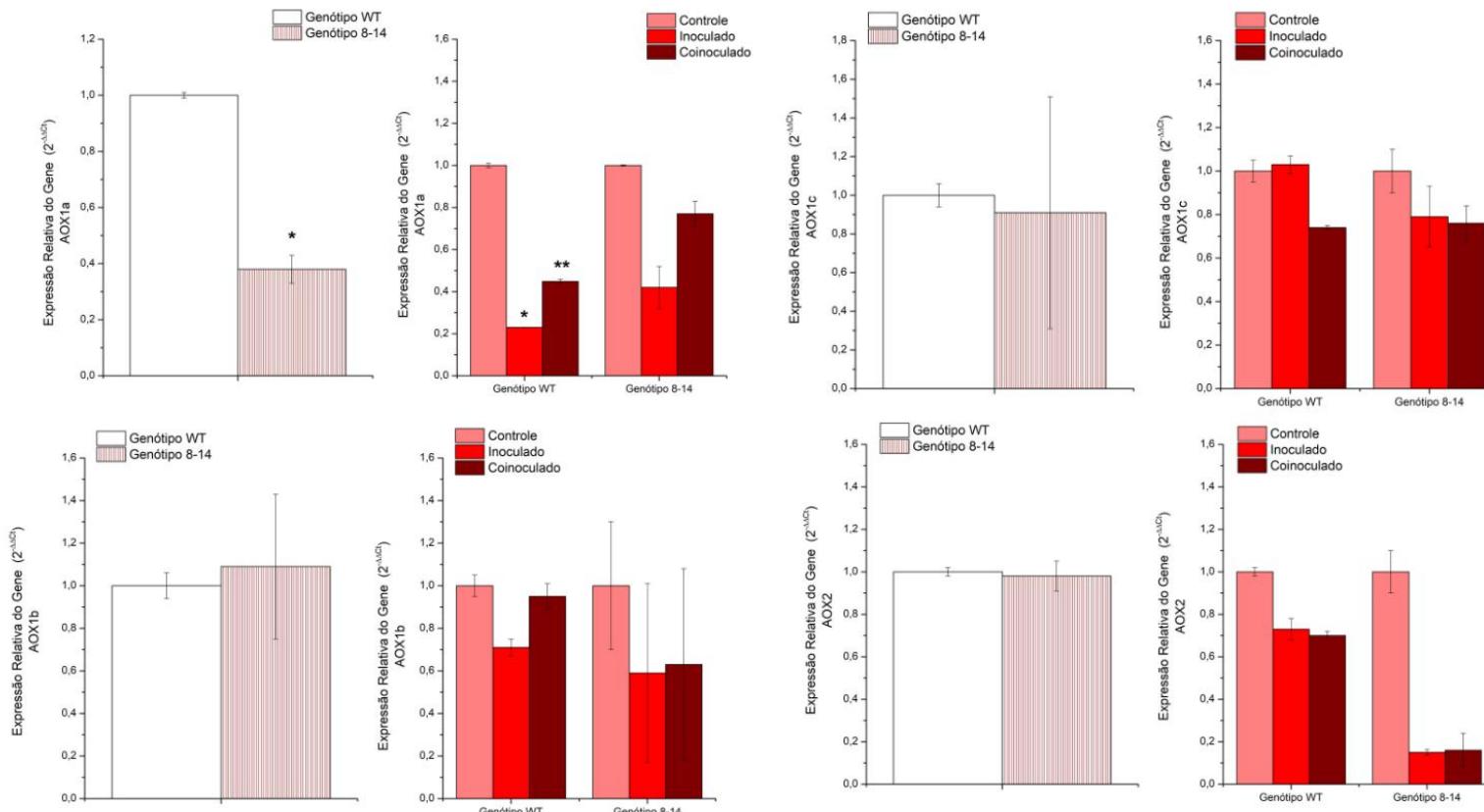


Figura 24: Expressão relativa dos genes relacionados a AOX em frutos maduros de tomate. À esquerda, comparação da expressão gênica em plantas controle do genótipo WT (barra branca) e plantas controle do genótipo 8-14 (barra estriada). À direita está a comparação da expressão gênica em plantas controle (barra vermelho-claro), inoculadas (barra vermelha) e coinoculadas (barra vinho) do mesmo genótipo. Na primeira linha representam dados do gene da AOX1a, na segunda linha da AOX1b, a terceira linha a expressão da AOX1c e na quarta linha da AOX2. \*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). \*\*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ). \*\*\*: representam valores muito significativos quanto ao teste t de Student em 0,1% de probabilidade ( $p<0,001$ ).

Foi possível comprovar que a subexpressão do mutante 8-14 ainda está ativa com o gene da L-GalLDH subexpresso em todos os tecidos, mas com valores diferentes (Figura 25). Em raízes, a enzima L-GalLDH em plantas 8-14 é onde se apresenta com uma subexpressão maior de 98% em relação ao controle. Nas folhas, essa subexpressão é de 50% enquanto que nos frutos maduros é de 70%. Em relação aos tratamentos com *A. brasiliense* ABV5, a bactéria promoveu uma subexpressão de 70% em raízes de plantas inoculadas do genótipo WT. Ainda nesse mesmo genótipo, a coinoculação por sua vez levou a uma superexpressão do gene com valores 2,2 vezes maiores. Para o genótipo 8-14, contudo houve ainda uma subexpressão do gene em ambos os tratamentos com 70% de subexpressão em plantas inoculadas e 90% em plantas coinoculadas. Em folha, a presença de bactéria causou padrões opostos. No genótipo WT, plantas coinoculadas tiveram uma superexpressão do gene da L-GalLDH com 6 vezes mais expressão. Em plantas inoculadas não houve valores significativos, mas pode se observar uma tendência a superexpressão do gene também ( $p=0,057$ ). Em plantas do genótipo, contudo, a presença da bactéria seja no tratamento inoculado ou coinoculado causou uma subexpressão do gene em 50%. Nos frutos, no genótipo WT, a bactéria também levou a supressão do gene em cerca de 60%. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística.

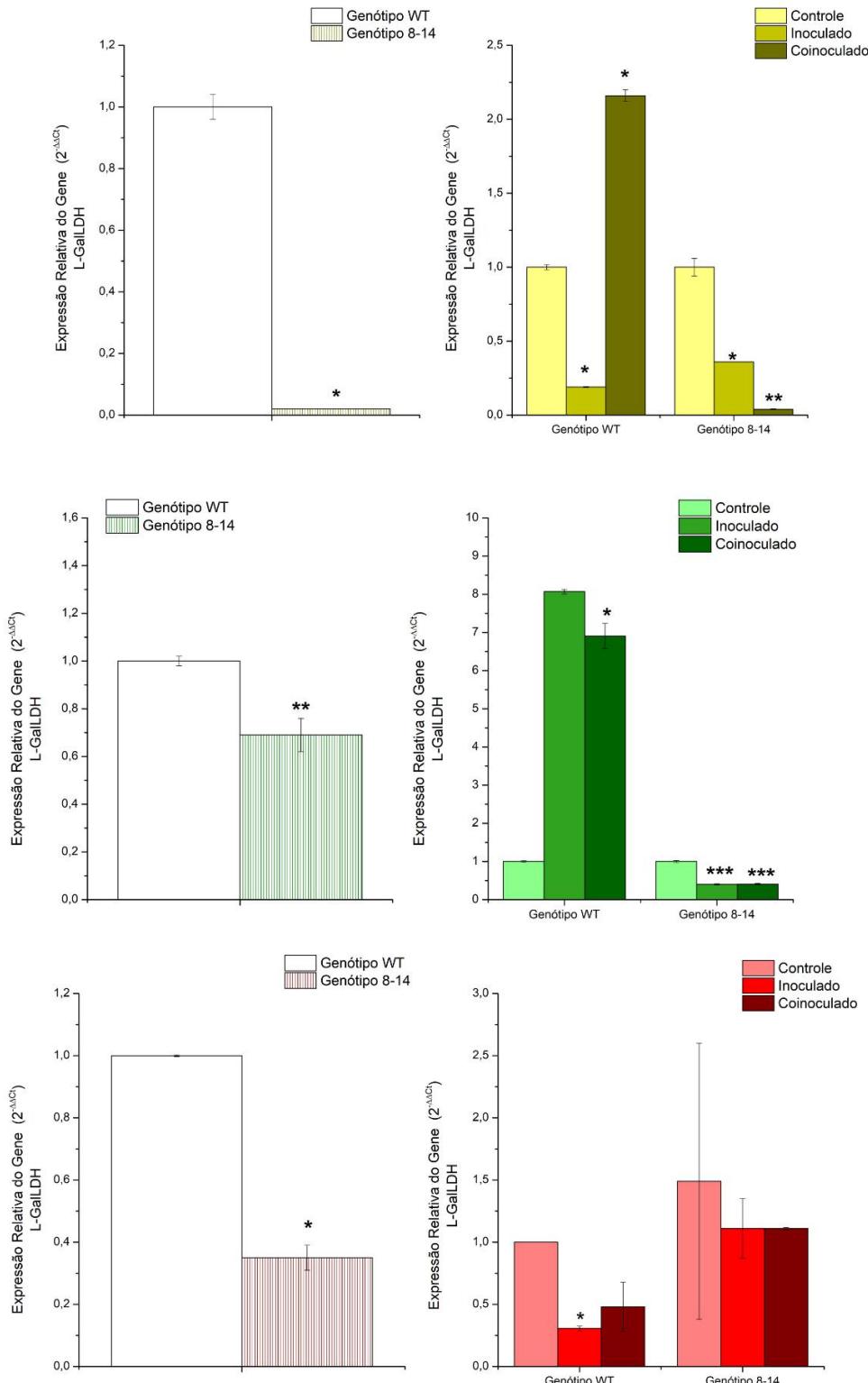


Figura 25: Expressão relativa do gene da L-GaLDH em diferentes tecidos do tomateiro. À esquerda, comparação da expressão gênica em plantas controle do genótipo WT (barra branca) e plantas controle do genótipo 8-14 (barra estriada). À direita está a comparação da expressão gênica em plantas controle (barra clara), inoculadas (barra mediana) e coinoculadas (barra escura). \*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). \*\*: representam valores significativos quanto ao teste t de Student em 1% de probabilidade ( $p<0,01$ ). \*\*\*: representam valores muito significativos quanto ao teste t de Student em 0,1% de probabilidade ( $p<0,001$ ).

## DISCUSSÃO

A bactéria *Azospirillum brasiliense* ABV5 é amplamente utilizada como parte da formulação de bioinoculantes empregados para promover o crescimento vegetal e aumentar a produtividade das lavouras. Verificamos que tanto a inoculação isolada quanto a coinoculação com o fungo *Trichoderma longibrachiatum* T476 estimularam o crescimento e o desenvolvimento do tomateiro, resultando em maior altura, área foliar, comprimento de raiz, biomassa e teor de clorofila como comprovado também por Okla et al. (2026). Esse estímulo inicial, observado aos 35 dias, tende a se atenuar no início da fase reprodutiva, quando a planta direciona recursos metabólicos para a formação de frutos. No entanto, após a colheita, esses efeitos podem se tornar novamente aparentes, possivelmente em função do aproveitamento dos nutrientes disponibilizados pelos microrganismos para sustentar maior número e/ou tamanho de frutos como observado por Andrade-Sifuentes et al. (2020). Os autores observaram, através de medições diárias, que após a inoculação de *A. brasiliense* em sementes de tomate da variedade TOP 229, as plantas inoculadas e não inoculadas se igualaram ao final do segundo mês pós-plantio em relação a sua altura e massa seca, apresentando diferenças novamente após mais 3 meses, no 5º mês pós-plantio.

Considerando a grande diferença apresentada nesse trabalho quanto a altura, comprimento de raiz e outras variáveis podemos explicar esses resultados devido à ação principal de *Azospirillum* de produzir diversos fitormônios como auxina, ácido abscísico, giberelina, citocinas, etileno e ácido salicílico, o qual atuarão melhorando o metabolismo da planta estimulando o seu crescimento, protegendo a planta de estresses, regulando o crescimento de raízes e a interação de microrganismos na rizosfera, retardando a senescência, além da capacidade da bactéria de fornecer nitrogênio à planta (Bottini et al., 1989; Cohen et al., 2008; Sahoo et al., 2014; Spaepen e Vanderleyden, 2015; Strzelczyk et al., 1994; Tien et al. 1979). O efeito que o *Azospirillum* tem na planta é sistêmico e ocorre em um padrão acumulativo, do qual diversas ações feitas pela bactéria se acumulam, de modo a promover o desenvolvimento da planta (Bashan e De-Bashan, 2010).

Nesse trabalho, não foi possível observar variações quanto ao aparato fotossintético. Comumente, a bactéria melhora a fotossíntese como uma medida de proteção em condições de estresse. A eficiência do fotossistema II aumentou em plantas de arroz inoculadas sob condições de estresse hídrico (Ruiz-Sánchez et al., 2011). Em condições de alagamento, a inoculação com *A. brasiliense* aumentou os níveis de eficiência do fotossistema II em rabanete (Salazar-Garcia et al., 2022). Lade et al. (2018) observaram que em plantas de milho inoculadas houve uma maior taxa fotossintética em plantas de tomate, segundo os autores, houve uma menor taxa fotossintética em comparação com plantas não inoculadas. Sendo assim, é possível perceber que o efeito da *A. brasiliense* varia sobre a fotossíntese, e considerando que não foi aplicado nenhum tipo de estresse, os resultados encontrados são justificados.

Podemos considerar, contudo, que o incremento na área foliar, o qual foi significativo em nosso trabalho, pode causar impactos na fotossíntese, tendo em vista que uma folha maior seria capaz de captar mais luz e assim, possivelmente, aumentar a taxa fotossintética na planta. Os níveis de SPAD e clorofila total também corroboram o impacto indireto da bactéria na fotossíntese nesse trabalho. A influência de um maior nível de clorofila era esperada, como demonstrado na literatura. Em trigo, Bashan et al. (2006) observaram um incremento aos níveis de clorofila a, clorofila b, zeaxantina, violaxantina, anteraxantina e outros pigmentos fotoprotetores. Isawa et al. (2010) verificaram um aumento nos níveis de clorofila em arroz e também foi comprovado que a inoculação com *Azospirillum* leva a um incremento de 15% no conteúdo de clorofila em aveia. O mesmo foi observado em soja por Moretti et al. (2021), os quais observaram um aumento no nível de clorofila e carotenoides nas plantas inoculadas. Alguns autores até mesmo consideram que o aumento no conteúdo de clorofila na planta é um indicador sensível que pode ser observado para confirmar a inoculação bem-sucedida (Raffi e Charyulu, 2021).

Sobre o índice relativo de clorofila, observamos resultados não diretamente relacionados com o conteúdo de clorofila absoluto medido por espectofotometria, principalmente no genótipo 8-14. Isso pode estar relacionado ao fato que o SPAD é uma medida indireta para a determinação da clorofila, a qual foi medida em apenas uma folha, enquanto que para a medição de clorofila absoluta a amostra

foi composta com todas as folhas da planta. Essa diferença no genótipo 8-14 também pode ser explicada devido à própria variação genética da planta.

Em nossos ensaios, a resposta à inoculação variou entre os diferentes genótipos de tomate em muitas variáveis, evidenciando a influência da informação genética das plantas na interação com microrganismos. Situação semelhante foi reportada por Rozier et al. (2019), que observaram aumento da taxa fotossintética na cultivar FriedriXX de milho inoculado com *A. lipoferum*, enquanto a cultivar FuturiXX não respondeu ao tratamento. Portanto, os efeitos de *A. brasiliense* devem ser compreendidos como espécie e genótipo-dependentes.

De modo geral, ao considerarmos o desenvolvimento das plantas nos diferentes recipientes percebe-se resultados diferentes nas plantas inoculadas e coinoculadas. Isso pode se relacionar ao fato de que em recipientes maiores a planta consegue se desenvolver melhor e assim, o efeito dos microrganismos diferem em relação ao que priorizar para melhorar o desenvolvimento das plantas. Contudo, se comparar essas plantas com as plantas não inoculadas fica evidente que os tratamentos com bactéria melhoram o crescimento e desenvolvimento das plantas em ambos os recipientes. Com isso, análises subsequentes, tais como a atividade da L-GalLDH, respiração mitocondrial e expressão gênica podem ser realizadas com plantas desenvolvidas nos recipientes pequenos, pois as mesmas não apresentam condições de estresse devido à restrição ao tamanho do recipiente para o crescimento.

É interessante considerar que apesar das alterações de crescimento e desenvolvimento observadas nesse trabalho, plantas de tomate começam a sua produção de frutos após 60 dias, com frutos verdes podendo ser colhidos após 80 dias. A bactéria, especialmente a cepa escolhida nesse trabalho só permanece na raiz durante 5 dias, como observado por Urrea-Valencia et al. (2020) em lavouras de trigo. A bactéria modula resposta na planta que permanece por muito tempo mesmo em frutos.

Nos resultados das variáveis analisadas em frutos, aqueles que advêm de plantas inoculadas apresentaram melhor relação de sólidos solúveis/acidez para ambos os genótipos, sugerindo melhor palatibilidade ao consumidor, além de maior conteúdo de AA. Andrade-Sifuentes et al. (2020) observaram em tomates de plantas inoculadas com *A. brasiliense* maior teor de sólidos solúveis e de concentração de AA, o que reforça os dados encontrados no nosso trabalho.

Contudo, o amadurecimento observado através da mudança de cor apresentou particularidades conforme a condição de armazenamento. Em temperatura ambiente, os frutos amadureceram mais rapidamente com as plantas não inoculadas apresentando quedas mais acentuadas e um menor valor de ângulo hue. Enquanto isso, frutos de plantas inoculadas e coinoculadas apresentaram maior variação de ângulo hue como evidenciado pela maior barra de erro apresentada nos gráficos. Essa variação também é explicada pela colheita dos frutos. Apesar dos mesmos serem colhidos no mesmo lote de plantas, na mesma época, com tamanhos e cores semelhantes, não necessariamente isso quer dizer que as flores sofreram fecundação no mesmo dia, apenas que seu desenvolvimento foi parecido no momento da colheita. Com essa diferença de inoculação supõe-se que os frutos podem ainda estar na fase de enchimento, podendo crescer ainda mais. A firmeza e coloração dos frutos verdes não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, indicando que a caracterização foi a mais precisa possível.

Considerando novamente o amadurecimento em diferentes temperaturas, os resultados encontrados em câmaras refrigeradas indicam que os frutos de plantas inoculadas alteraram a coloração mais rapidamente, principalmente considerando o genótipo WT, o qual a queda de ângulo hue é acentuada e aparece no início da avaliação. Esse resultado pode estar correlacionado à expressão gênica da AOX, que é modificada na presença de baixas temperaturas que será discutida mais adiante.

No metabolismo mitocondrial, as alterações mais expressivas foram observadas em plantas do genótipo 8-14 coinoculadas, que apresentaram maior respiração total em mitocôndrias de raiz e fruto na presença de NADH, acompanhada de menor taxa respiratória em folhas. Em todos os tecidos de plantas inoculadas, a participação da AOX na respiração total aumentou, embora a COX permanecesse como principal oxidase. Esses resultados sugerem que *A. brasiliense* atua como regulador CTEm, estimulando a atividade da AOX para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e minimizar o estresse oxidativo mitocondrial. Por outro lado, quando o substrato utilizado foi L-GaL, observou-se efeito contrário, com supressão da respiração via AOX e aumento da via COX.

Considerando a atividade da enzima L-GalLDH é importante relembrar que mecanismo primário defensivo contra o estresse oxidativo nas plantas são as enzimas antioxidantes como superóxido desmutase, catalase e ascorbato peroxidase (Hasanuzzaman et al., 2020.). Isso é facilmente comprovado na literatura onde diversas culturas se beneficiam de uma maior atividade de enzimas antioxidantes capazes de evitar situações de estresse oxidativo extremo como milho (Fukami et al., 2017; Okla et al., 2026), manjericão (Heidari e Golpayegani, 2012), alface (Han e Lee, 2005) e trigo (Upadhaya et al., 2012).

Considerando que o AA é uma importante molécula antioxidante, os efeitos da bactéria no metabolismo do AA são muito inexplorados. Os nossos resultados indicam que a bactéria nos tratamentos inoculados não alterou a atividade da L-GalLDH em fruto, apesar do fato de ter sido encontrado nos mesmos maiores níveis de AA. Alhagdow et al. (2007) indicam que a baixa atividade da L-GalLDH não implica necessariamente menor teor de AA como observado em mutantes de tomate silenciados para a enzima L-GalLDH. No genótipo 8-14, por exemplo, a inoculação pode ter estimulado vias alternativas de síntese ou regeneração de AA não dependentes da L-GalLDH. Sendo assim, o maior conteúdo de AA é explicado por outras rotas de síntese, o que reduz a necessidade de síntese do mesmo, resultando em menor atividade da L-GalLDH.

Matteo et al. (2010) verificaram a expressão de diversos genes relacionados à degradação de pectina em plantas que produzem baixa concentração de AA através do transcriptoma dessas plantas. Eles concluíram que maiores níveis de AA estão relacionados a uma maior produção e pouca utilização de AA, com essa maior produção sendo regulada pelos genes que determinam a degradação de pectina da parede celular. Os autores não encontram uma ligação entre as plantas com alto maior teor e baixo teor de AA e a via de Smirnoff-Wheeler na qual a L-GalLDH desempenha a última etapa da síntese. Outra hipótese que explica o maior teor de AA no fruto seria a maior eficiência de regeneração de AA via ciclo ascorbato-glutathiona, hipótese que poderia ser confirmada por análises enzimáticas específicas como observado por Mellidou et al. (2021).

Em raízes, não foram observadas alterações significativas na atividade da L-GalLDH, corroborando Herschbach et al. (2009), que destacam que o AA radicular é majoritariamente produzido e transportado de folhas maduras via

floema. Nas folhas, entretanto, *A. brasiliense* ABV5 estimulou a atividade da enzima e aumentou a expressão do gene L-GalLDH no genótipo selvagem, sugerindo uma possível maior produção de AA nesse tecido. Curiosamente, no mutante, observou-se resposta distinta, com maior atividade enzimática apenas em tratamentos coinoculados, evidenciando novamente a influência do genótipo ou ainda a ação do *T. longibrachiatum* T476 no metabolismo. Os resultados em folhas e em raiz quanto à atividade da enzima precisam ser mais trabalhados, principalmente com a quantificação de AA que comprovem uma possível redução ou aumento do conteúdo de AA nesses tecidos.

A utilização de substratos e inibidores da AOX durante atividade de L-GalLDH reforça a complexidade da relação entre essa oxidase e a enzima. Embora o piruvato seja reconhecido como ativador da AOX, favorecendo o fluxo de elétrons para o citocromo c, não observamos estímulo da L-GalLDH em sua presença. Uma possível explicação é que a bactéria tenha induzido isoformas de AOX insensíveis ao piruvato e ativadas por succinato devido à mudança em pontes dissulfeto na proteína (Fung et al., 2006). Isso explicaria a inibição completa da L-GalLDH pelo nPG e a ausência de inibição do SHAM observados neste estudo. Silva et al. (2024) também reforçam a dependência indireta da L-GalLDH em relação a AOX, indicando que inibidores da oxidase reduzem tanto a produção de AA quanto a atividade da enzima em mitocôndrias de mamão e morango, mas essa relação não depende da disponibilidade de citocromo c. Os autores indicam uma inibição da atividade da mesma, levando a uma maior produção de ROS, os quais inibem a L-GalLDH. Ainda assim, mesmo em níveis baixos de AOX, ela é necessária para a atividade da L-GalLDH. A interação entre L-GalLDH e AOX é complexa, bem como a influência das isoformas da AOX sobre a enzima, permanecendo assim um campo aberto para investigação.

Em relação ao gene L-GalLDH, é interessante notar que em nódulos de leguminosas existe a produção de AA devido à necessidade da molécula antioxidante para o estabelecimento da simbiose (Matamoros et al., 2006). De forma análoga, a maior expressão desse gene em raízes de tomate pode refletir uma maior demanda de AA para o estabelecimento da interação rizosférica com a bactéria. Considerando que *A. brasiliense* tem uma maior população presente na rizosfera por apenas cerca de 5 dias após a inoculação (Urrea-Valencia et al., 2021), a subexpressão do gene pode ser esperada posteriormente. Ainda assim,

a superexpressão observada em tratamentos coinoculados no genótipo selvagem é intrigante, podendo estar relacionada a situações de estresse ou à necessidade de formação de novo tecido radicular. A expressão gênica em folha por outro lado, principalmente no genótipo 8-14 onde foi observado uma menor expressão, pode se correlacionar aos resultados encontrados sobre a atividade da enzima no nosso trabalho. Com uma L-GalLDH mais ativa, não existe a necessidade de produção de mais proteína e assim o gene é subexpresso. O oposto acontece nas plantas do genótipo WT, com uma menor atividade da enzima e uma superexpressão gênica pode ser necessária para uma possível maior produção de AA. Em frutos inoculados, com uma maior quantidade de AA, uma subexpressão da enzima no genótipo WT pode ser explicada pela falta de maior produção de AA naquele momento ou ainda devido à alta atividade enzimática quantificada nesse tratamento.

Além disso, devemos também considerar como a expressão relativa da L-GalLDH pode estar relacionada com outros parâmetros fisiológicos da planta. Muitos resultados na literatura com mutantes para a L-GalLDH mostram resultados variáveis para diversas características. Em plantas de alface mutantes superexpressando a enzima, foi observado que as plantas mutantes apresentam 30% mais ácido ascórbico que torna essas plantas mais resistentes ao processo de escurecimento em até 10 dias após o corte da planta (Landi et al., 2015). Tokunaga et al. (2005) observaram em células de tabaco superexpressando a L-GalLDH maiores níveis de AA e uma maior resistência a metil viologênio, que produz espécies reativas de oxigênio. Esses autores indicam que essas plantas com altos teores de AA podem ser resistentes a estresses ambientais. Por outro lado, em outro estudo, com plantas de tabaco superexpressando a enzima, não foi verificado maior nível de AA no vegetal em comparação com o controle (Imai et al., 2009).

Em estudos com arroz, foi possível observar variação nos níveis de AA devido a mutações para a enzima L-GalLDH, seja quando houve o silenciamento ou quando havia superexpressão do gene da enzima (Yu et al., 2015; 2017). Plantas de arroz transgênicas com alterações no gene da L-GalLDH, apresentam mudanças no seu estado redox, com plantas com a L-GalLDH subexpressada apresentando um acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menor nível de AA e de sua atividade antioxidante (Yu et al., 2020). Ainda nesse trabalho, verificou-se que as plantas

que superexpressam a enzima, possuem menor acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, com as alterações na concentração de AA devido à mutação, as plantas de arroz possuíam muitos transcritos gênicos que fazem parte da síntese de estrigolactonas. Com essa alteração, os autores indicaram que a atividade da L-GalLDH é capaz de interferir na formação de perfilhos nas plantas de arroz.

Ao analisar o efeito da L-GalLDH no estresse por temperatura, Zhang et al. (2018) indicaram que folhas excisadas de plantas mutantes de arroz apresentaram alteração no rendimento quântico máximo do PSII. Os autores verificaram que em mutantes que superexpressam a enzima, após o tratamento em alta temperatura, as folhas apresentaram níveis reduzidos de ROS em comparação ao controle e às folhas de plantas com a L-GalLDH suprimidas. Nesses mutantes com subexpressão da enzima, o rendimento quântico do PSII foi menor com maiores teores de ROS. Plantas com maior expressão da enzima apresentam altos níveis de AA e menores níveis de peroxidação lipídica. Os autores ainda mostram que existe uma relação positiva entre os teores de clorofila, proteínas solúveis e subunidades da Rubisco com o acúmulo de AA. Segundo Liu et al. (2011), plantas de arroz com supressão de L-GalLDH apresentam menores níveis de clorofila e de Rubisco, bem como um atraso no crescimento e um aumento na peroxidação lipídica na folha. Enquanto que plantas superexpressando essa enzima, demonstraram níveis maiores de clorofila e Rubisco, bem como altos níveis de fotossíntese com maior produtividade de sementes (Liu et al., 2011).

Em *Arabidopsis*, mutantes superexpressando a L-GalLDH apresentaram incremento na concentração de AA, bem como maiores níveis de fluorescência de clorofila (Zheng et al., 2019). O estudo realizado em condições de estresse luminoso verificou que as plantas mutantes acumularam mais AA, antocianinas, flavonoides e fenólicos nessas condições. Desse modo, os autores indicam que mutantes de *Arabidopsis* com maior expressão da L-GalLDH possuem maior tolerância ao estresse luminoso, sendo capazes de dissipar a energia térmica mais eficientemente ao absorver a luz extra ao mesmo tempo que elimina ROS. Outro estudo com mutantes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando a L-GalLDH e com maiores níveis de AA endógeno, verificou que essas plantas apresentam maiores teores de Rubisco, de pigmentos fotossintéticos, de capacidade antioxidante e menores expressões de genes ligados à senescência

foliar após serem pulverizadas com etefon comparado com plantas mutantes com baixo teor de AA (Zheng et al., 2020).

Nossos resultados indicam que o efeito da bactéria sobre a expressão da L-GalLDH encontrado nesse trabalho pode se relacionar sistematicamente com diversos desdobramentos no metabolismo da planta, até mesmo reforçando a hipótese que o efeito da bactéria na planta é acumulativo com ela regulando diversos pontos para melhorar a fotossíntese, metabolismo antioxidante, metabolismo respiratório entre outros. Além disso, considerando que a *A. brasiliense* promove efeitos diferentes ligados aos genótipos que observamos, é válido considerar que apesar da mutação acontecer apenas na enzima L-GalLDH essa alteração está relacionada com diferentes desdobramentos na planta, reforçando ainda mais os efeitos produzidos pela bactéria que podem ser genótipo-dependentes.

No que se refere à expressão gênica encontrada nos tecidos em relação a ubiquinona, a mutação da L-GalLDH alterou a expressão em folhas e raízes, mas não em frutos. Pravst e colaborados revisaram e compararam a quantidade encontrada de coenzima Q, ubiquinona, em diversos alimentos. Através de sua comparação é possível perceber que em grãos, raízes e folhas o conteúdo de ubiquinona acumulado é muito mais elevado do que o conteúdo encontrado em frutos. Em tomate, por exemplo, a concentração de ubiquinona está em torno de 0,9mg/kg, enquanto que em espinafre esse valor pode chegar a 10,2 mg/kg e em cenoura a concentração mínima é de 2,2 mg/kg. Por isso, podemos considerar que o gene da ubiquinona em frutos de tomate pode não variar devido ao genótipo apresentado, sendo bem conservado e até mesmo utilizado como gene de referência para a L-GalLDH nos frutos de linhagem 8-14 (Morales et al., 2022).

A expressão gênica da ubiquinona em folhas e raízes de tomate, por outro lado, é pouco explorada na literatura. Em nosso trabalho percebe-se que a inoculação com *A. brasiliense* promoveu uma subexpressão do gene em raiz e fruto em ambos os genótipos. Em folha, porém, no genótipo 8-14 levou a uma menor expressão e a uma superexpressão no genótipo selvagem. É preciso relacionar esses resultados com as diversas funções a qual ubiquinona apresenta no metabolismo vegetal. Apesar de ser conhecida principalmente por seu papel na CTEm, a ubiquinona também está relacionada ao metabolismo de aminoácidos e à eliminação de radicais livres na mitocôndria (Liu e Lu, 2016). Nas

folhas, onde houve a superexpressão do gene, podemos relacionar esse resultado com uma maior respiração mitocondrial nesse tecido. Com uma CTEm mais ativa, uma maior produção de ROS é produzida, o que pode necessitar da ubiquinona em seu papel antioxidante. Além disso, a ubiquinona recebe os elétrons do complexo I, das NADH desidrogenases e do complexo II, sendo extremamente necessária se considerarmos uma maior taxa respiratória como encontrada nas raízes de plantas coinoculadas no genótipo mutante aonde observou-se uma tendência para maior expressão gênica. Por outro lado, uma menor taxa respiratória como em plantas coinoculadas do genótipo 8-14 poderia levar a uma menor necessidade de ubiquinona em folhas e com isso uma menor expressão do gene como o resultado obtido nesse trabalho. O efeito da bactéria também causou uma menor expressão no gene da ubiquinona em frutos de plantas coinoculadas do genótipo 8-14 apesar da respiração mitocondrial ser maior nesse tratamento.

Logo, ao mesmo tempo que pode se correlacionar a expressão gênica da ubiquinona com a taxa respiratória mitocondrial, o efeito da bactéria nos diferentes tecidos foi divergente, necessitando de mais estudos para melhor compreensão da regulação gênica da ubiquinona em plantas inoculadas e mutantes. Alguns trabalhos também correlacionam a AOX e a ubiquinona. Em mutantes de tomate, que apresentam maior nível de ubiquinona, foi possível perceber que o gene para AOX1 segue a expressão do gene da ubiquinona (Fan et al., 2021). Sendo assim, maior expressão da ubiquinona representa maior expressão da AOX1, enquanto o oposto também ocorre. Resultado aqui observado em raízes, para ambos os genótipos, e em folhas, quando correlacionamos apenas AOX1c com a ubiquinona, relacionam-se com o estudo de Fan et al., 2021.

Cerca dos genes da AOX, destacam-se as proteínas codificadas por cada gene AOX1a, AOX1b, AOX1c e AOX2 (Fung et al., 2006; Holtzapffel et al., 2003). A AOX1b, por exemplo, não forma dímeros ligados por pontes dissulfetos e é ativada por succinato, sendo mais expressa sob estresse severo. Essa proteína é considerada sempre ativa e uma forma menos regulada de AOX sobre condições adversas (Holtzapffel et al., 2003). Os autores ainda indicam que AOX codificada pelo gene AOX1a está ligada à respiração celular e ao controle do balanço energético.

Em nosso estudo, folhas de genótipo WT inoculado apresentaram maior expressão de AOX1a, possivelmente em resposta à elevada produção de ROS decorrente de uma intensa atividade fotossintética (Saha et al., 2016). Em contraste, folhas do genótipo 8-14 inoculado exibiram subexpressão do mesmo gene, confirmando uma possível diferença genotípica. Por fim, a menor expressão da AOX1a em frutos inoculados pode ter contribuído para a redução de sólidos solúveis, como relatado por Xu et al. (2012) em tomate. Embora nesse trabalho os valores não tenham sido estatisticamente significativos, a tendência de menor SS nos frutos inoculados e coinoculados do genótipo WT sugere uma associação com a regulação do amadurecimento mediada pela AOX. Além disso, a rápida mudança de cor (ângulo hue) em frutos de plantas inoculadas armazenados a 11 °C pode estar relacionada à expressão de AOX1a, uma vez que esse gene regula negativamente a síntese de etileno e influencia diretamente o processo de amadurecimento e é estimulado por alterações ambientais (Xu et al., 2012). Além disso, Fung et al., 2006 também indicaram que em condições de baixa temperatura há uma inibição do splicing desse gene, principalmente em raízes e frutos de tomate, relacionado com a quantidade de transcritos produzidos pelas plantas. Desse modo, são produzidas proteínas não funcionais resultando na produção de ROS e levando ao estresse oxidativo com danos aos tecidos das plantas. Reforçando o trabalho de Fung et al., 2006, Considine et al. (2001) indicam que as diferentes isoformas da AOX são reguladas variavelmente a depender do desenvolvimento da planta e as variações no seu ambiente, desse modo, a AOX1 a e AOX1b respondem de modo diferente a variáveis como temperatura.

Determinou-se que a inoculação com *A. brasiliense* ABV5, isolada ou em coinoculação com *T. longibrachiatum* T476, modulou o crescimento, o metabolismo mitocondrial e a qualidade pós-colheita dos frutos de tomateiro de maneira dependente do genótipo. Reforçando, assim, que a interação planta-microrganismo é complexa e sistemática e contando com diversos fatores que impactam desde a regulação do balanço redox até o acúmulo de moléculas de interesse como o ácido ascórbico. A bactéria tem potencial de gerar respostas bastante diversas, mas promissoras, podendo ser considerada benéfica e generalista e não apenas utilizadas em plantas de trigo, milho, soja e onde são mais estudadas. Devido à sua diversidade de resposta, o emprego de *A.*

*brasiliense* em diferentes culturas e genótipos pode esclarecer cada vez mais sobre os diferentes mecanismos de ação da bactéria nas plantas.

## CONCLUSÕES

Este trabalho buscou compreender se a bactéria *A. brasiliense* ABV5 atua no metabolismo respiratório mitocondrial, no metabolismo do ácido ascórbico e na qualidade e pós-colheita. Considerando os resultados encontrados, pode-se concluir que a bactéria altera o metabolismo e a bioquímica da planta e do fruto de tomate, seja na CTEm ou através da enzima L-GalLDH.

Evidenciou-se que o efeito do *A. brasiliense* ABV5 não se limita ao estímulo de crescimento, mas envolve mecanismos profundos de regulação bioquímica e molecular. Além disso, a resposta diferenciada entre genótipos reforça o caráter genótipo-dependente dessas interações, destacando a necessidade de se considerar a base genética da planta para compreender a eficácia e os limites das BPCV.

Outro ponto relevante de descoberta foi que *A. brasiliense* ABV5 atua como modulador do balanço redox mitocondrial, estimulando mecanismos que reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio e conferem maior proteção contra estresse oxidativo como a AOX e ubiquinona na CTEm. Ao mesmo tempo, o aumento no conteúdo de ácido ascórbico nos frutos inoculados revela benefícios potenciais não apenas para a fisiologia vegetal, mas também para a qualidade nutracêutica do tomate, característica de grande interesse para consumidores e para a indústria alimentícia.

Essa pesquisa ampliou a compreensão sobre os mecanismos de ação de bioinoculantes em tomateiro, ao integrar análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares em folhas, raízes e frutos. Ao demonstrar que *A. brasiliense* ABV5 pode influenciar processos centrais do metabolismo vegetal, é possível reafirmar a relevância do uso de BPCV como ferramenta estratégica para o melhor desenvolvimento da planta. Considerando que o efeito desse tipo de bactéria na planta é bem diverso, abrem-se novas perspectivas para futuras pesquisas sobre os diversos mecanismos de interação bactéria-planta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeleke, B.S.; Babalola, O.O.; Glick, B.R. (2021) Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 20:1-12. DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100433.
- Agius, F.; González-Lamothe, R.; Caballero, J.L.; Muñoz-Blanco, J.; Botella, M.A.; Valpuesta, V. (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21(2): 177–181. DOI: 10.1038/nbt777.
- Akram, N.A.; Shafiq, F.; Ashaf, M. (2017) Ascorbic acid - a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8(4): 1-17. DOI: 10.3389/fpls.2017.00613.
- Alhagdow, M.; Mounet, F.; Gilbert, L.; Nunes-Nesi, A.; Garcia, V.; Just, D.; Petit, J.; Beauvoit, B.; Fernie, A.R.; Rothan, C.; Baldet, P. (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 145(4): 1408–1422. DOI: 10.1104/pp.107.106500
- Andrade-Sifuentes, A.; Fortis-Hernández, M.; Preciado-Rangel, P.; Orozon-Vidal, J.; Coronado, P.; Rueda-Puente, E.O. (2020) Azospirillum brasilense and solarized manure on the production and phytochemical quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomy*, 10:1956. DOI: 10.3390/agronomy10121956.
- Arrigoni, O.; Tullio, M.C.De. (2002) Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1569(3): 1–9. DOI: 10.1016/s0304-4165(01)00235-5.
- Attolico, A.D.; Tullio, M.C.De. (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(7): 462–466. DOI: 10.1016/j.plaphy.2006.08.002.
- Awad, J.; Stotz, H.U.; Fekete, A.; Krischke, M.; Engert, C.; Havaux, M.; Berger, S.; Mueller, M.J. (2015) 2-Cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate

peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiology*, 167(4): 1592–1603. DOI: 10.1104/pp.114.255356.

Barth, C.; Tullio, M. De; Conklin, P.L. (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): 1657–1665. DOI: 10.1093/jxb/erj198.

Bartoli, C.G.; Pastori, G.M.; Foyer, C.H. (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology*, 123(1): 335-343. DOI: 10.1104/pp.123.1.335.

Bartoli, C.G.; Senn, M.E.; Gergoff Grozeff, G.E. (2016) Physiological processes contributing to the synthesis of ascorbic acid in plants. In: Gupta, D. K.; Palma, J. M.; Corpas, F. J. (Eds.). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*, 1ed., New York: Springer, p. 71–92.

Bartoli, C.G.; Yu, J.; Gómez, F.; Fernández, L.; McIntosh, L.; Foyer, C.H. (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(8):1621-1631. DOI: 10.1093/jxb/erl005.

Bashan, Y.; Levanony, H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36: 591–608. DOI: 10.1139/m90-105

Bashan, Y.; De-Bashan, L.E. (2010) *How the plant growth-promoting bacterium Azospirillum promotes plant growth-a critical assessment*. 1. Ed. New York: Elsevier Inc.

Benlloch, R.; Farre, R.; Frigola, A. (1993) A quantitative estimate of ascorbic and isoascorbic acid by high performance liquid chromatography: application to citric juices. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 16(14): 3113-3122. DOI: 10.1080/10826079308019637.

Bilska, K.; Wojciechowska, N.; Alipour, S.; Kalemba, E.M. (2019) Ascorbic acid: the little-known antioxidant in woody plants. *Antioxidants*, 8 (12): 1–23. DOI: 10.3390/antiox8120645.

- Borestein, B. (2017) The role of ascorbic acid in plant-pathogen interaction. In: Hossain, M.A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (Eds.). *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 255–271.
- Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D.; Pharis, R.P. (1989) Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology* 90:45–47. DOI: 10.1104/pp.90.1.45.
- Bradford, M.M. (1976) Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-259. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Braun, H.P. (2020) The oxidative phosphorylation system of the mitochondria in plants. *Mitochondrion*, 53(1): 66–75. DOI: 10.1016/j.mito.2020.04.007.
- Cassán, F.; Diaz-Zorita, M. (2016) *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103: 117–130. DOI: 10.1016/j.soilbio.2016.08.020.
- Cassán, F.; Vanderleyden, J.; Spaepen, S. (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2): 440–459. DOI: 10.1007/s00344-013-9362-4.
- Chen, C.; Letnik, I.; Hacham, Y.; Dobrev, P.; Ben-Daniel, B.H.; Vanková, R.; Amir, R.; Miller, G. (2014) Ascorbate peroxidase 6 protects *Arabidopsis* desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiology*, 166(1): 370–383. DOI: 10.1104/pp.114.245324.
- Chen, Z.; Gallie, D.R. (2012) Induction of monozygotic twinning by ascorbic acid in tobacco. *PLoS ONE*, 7(6): 1–12. DOI: 10.1371/journal.pone.0039147.
- Cohen, A.C.; Bottini, R.; Piccoli, P.N; (2008) *Azospirillum brasiliense* Sp. 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA contente in *Arabidopsis* plants. *Plant Growth Regul* 54:97–103. DOI: 10.1007/s10725-007-9232-9

Considine, M.J.; Daley, D.O.; Whelan, J. (2001) The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology* 126: 1619–29. DOI: 10.1104/pp.126.4.1619.

Creus, C.M.; Sueldo, R.J.; Barassi, C.A. (1998) Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany*, 76(2):238-244. DOI: 10.1139/b97-178.

Dey, R.; Pal, K.K.; Tilak, K.V.B.R. (2014) Plant growth promoting rhizobacteria in crop protection and challenges. In: Goyal, A.; Manoharachary, C. (Eds.). *Future challenges in crop protection against fungal pathogens*. New York: Springer, p. 31–58.

Dobbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Okon, Y.; Vanderleyden, J. (2002) Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasiliense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36(4): 284–297. DOI: 10.1007/s00374-002-0534-9.

Döbereiner, J. (1992) Recent changes in concepts of plant bacteria interaction: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. *Ciência e Cultura*, 44: 310-313.

Esquivel-Cote, R.; Ramírez-Gama, R. M.; Tsuzuki-Reyes, G.; Orozco-Segovia, A.; Huante, P. (2010) *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and Soil*, 337(1): 65–75. DOI: 10.1007/s11104-010-0499-7.

Fan, H.; Liu, Y.; Li, C.; Jiang, Y.; Song, J.; Yang, L.; Zhao, Q.; Hu, Y.; Chen, X.; Xu, J.; (2021) Engineering high coenzyme Q10 tomato. *Metabolic Engineering*, 68:86-93. DOI: 10.1016/j.ymben.2021.09.007.

FAO (2021). Marco estratégico para 2022-2031. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/ne577es/ne577es.pdf>>. Acesso em abril, 2022.

Fenech, M.; Amaya, I.; Valpuesta, V.; Botella, M. A. (2019) Vitamin C content in fruits: biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, 9: 2006. DOI: 10.3389/fpls.2018.02006.

Ferreira, M.J.; Silva, H.; Cunha, A. (2019) Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. *Pedosphere*, 29: 409-420. DOI: 10.1016/S1002-0160(19)60810-6

Fibach-Paldi, S.; Burdman, S.; Okon, Y. (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 326(2): 99–108. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02407.x.

Fukami, J.; Cerezini, P.; Hungria, M. (2018) Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8:73. DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1.

Fukami, J.; La Osa, C.; Ollero, F.J.; Megías, M.; Hungria, M. (2018) Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3): 328–339. DOI: 10.1071/FP17167.

Fukami, J.; Ollero, F.J.; Megías, M.; Hungria, M. (2017) Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*, 7(1): 153. DOI: 10.1186/s13568-017-0453-7.

Fung, R.W.M.; Wang, C.Y.; Smith, D.L.; Gross, K.C.; Tao, Y.; Tina, M. (2006) Characterization of alternative oxidase (AOX) gene expression in response to methyl salicylate and methyl jasmonate pre-treatment and low temperature in tomatoes. *Journal of Plant Physiology*, 163: 1049-1060. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.11.003.

Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria : mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012:1-15. DOI: 10.6064/2012/963401.

González-Reyes, J.A.; Alcaín, F.J.; Caler, J.A.; Serrano, A.; Córdoba, F.; Navas, P. (1994) Relationship between apoplastic ascorbate regeneration and the stimulation of root growth in *Allium cepa* L. *Plant Science*, 100(1): 23–29. DOI: 10.1016/0168-9452(94)90130-9.

- Gordon, D.S.; Rudinsky, A.J.; Guillaumin, J.; Parker, V.J.; Creighton, K.J. (2020) Vitamin C in health and disease: a companion animal focus. *Topics in Companion Animal Medicine*, 39: 100432. DOI: 10.1016/j.tcam.2020.100432.
- Hall, P.G.; Krieg, N.R. (1984) Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasiliense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2): 433–435. DOI: 10.1128/aem.47.2.433-435.1984.
- Han, H.S.; Lee,K.D. (2005) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1:210–215. DOI:
- Hasanuzzaman, M.; Bhuyan, M.H.M.B.; Zulfiqar, F.; Raza, A.; Mohsin, S.M.; Mahmuda, J.A.; Fujita, M.; Vasileios, F. (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9:681. DOI: 10.3390/antiox9080681.
- Heidari, M.; Golpayegani, A. (2012) Effects of water stress and inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on antioxidant status and photosynthetic pigments in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*,11(1): 57–61. DOI: 10.1016/j.jssas.2011.09.001.
- Herschbach, C.; Scheerer, U.; Rennenberg, H. (2010) Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar depend on phloem transport from the shoot to the roots. *Journal of Experimental Botany* 61(4): 1065-1074. DOI: 10.1093/jxb/erp371
- Hidalgo, A.; Gonzalez-Reyes, J.A.; Navas, P. (1989) Ascorbate free radical enhances vacuolization in onion root meristems. *Plant, Cell & Environment*, 12(4): 455–460. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1989.tb01962.x.
- Holtzapffel, R.C.; Castelli, J.; Finnegan, P.M.; Millar, A.H.; Whelan, J.; Day, D.A. (2003) A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties. *Biochemistry Biophysics Acta*, 1606:153–62. DOI: 10.1016/S0005-2728(03)00112-9.

- Hossain, M.A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (2017) Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance. Springer International, 1<sup>a</sup> edição.
- Imai, T.; Niwa, M.; Ban, Y.; Hirai, M.; Ôba, K.; Moriguchi, T. (2009) Importance of the L-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by L-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1) 105–112. DOI: 10.1007/s11240-008-9466-x.
- Iqbal, N.; Khan, N. A.; Ferrante, A.; Trivellini, A.; Francini, A.; Khan, M. I. R. (2017) Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8(4): 1–19. DOI: 10.3389/fpls.2017.00475.
- Isawa, T.; Yasuda, M.; Awazaki, H.; Minamisawa, K.; Shinozaki, S.; Nakashita, H. (2010) *Azospirillum* sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes and Environment*, 25: 58–61. DOI: 10.1264/jsme2.me09174.
- Ivanov, B.N. (2014) Role of ascorbic acid in photosynthesis. *Biochemistry*, 79(3): 282–289. DOI: 10.1134/S0006297914030146.
- Jain, A.K.; Nessler, C.L. (2000) Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Molecular Breeding*, 6(1): 73–78. DOI: 10.1023/A:1009680818138.
- Jeyarajan, R.; Nakkeeran, S. (2000) Exploitation of microorganisms and viruses as biocontrol agents for crop disease management. *Biocontrol Potential and its Exploitation in Sustainable Agriculture*, 1:95–116. DOI: 10.1007/978-1-4615-4209-4\_8.
- Kitajima, E.W.; Leite, B. (1999) *Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura. Apostila de apoio*. São Paulo: Núcleo de apoio à pesquisa em microscopia eletrônica ESALQ/USP, p.46.
- Kloepper, J.W.; Schloth, M.N. (1980) Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 71(6): 642-644.

Kumar, S.; Diksha; Sindhu, S.S.; Kumar, R. (2022) Biofertilizers: an ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 3: 100094

Lade, S.B.; Román, C.; Cueto-Ginzo, A.I.; Serrano, L.; Sin, E.; Achón, M.A.; Medina, V. (2018) Host-specific proteomic and growth analysis of maize and tomato seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* Sp7. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129:381-393. DOI: 10.1016/j.crmicr.2021.100094.

Landi, M.; Fambrini, M.; Basile, A.; Salvini, A.; Guidi, L.; Pugliesi, C. (2015) Overexpression of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) gene correlates with increased ascorbate concentration and reduced browning in leaves of *Lactuca sativa* L. after cutting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123: 109-120. DOI: 10.1007/s11240-015-0819-y.

Larraburu, E.E.; Bususcovich, A.C.; Llorente, B.E. (2016) *Azospirillum brasilense* improves in vitro and ex vitro rooting-acclimatization of jojoba. *Scientia Horticulturae*, 209:139-147. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.06.016.

Leferink, N.G.H.; Berg, W. A. M. V.; Berkel, W.J.H. (2008) L-Galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS Journal*, 275(4): 713–726. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x

Leferink, N.G.H.; Berkel, W.J.H.Van. (2014) Aldonolactone oxidoreductases. In: Weber, S.; Schleicher, E. (Eds.). *Flavins and flavoproteins: methods and protocols*. New York : Springer Science, p. 111.

Li, M.; Ma, F.; Liang, D.; Li, J.; Wang, Y. (2010) Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumulation in kiwi. *PLoS ONE*, 5(12): 14281. DOI: 10.1371/journal.pone.0014281.

Lira, D.N.DeS.; Arauco, A.M.DeS.; Boechat, C.L.; Moitinho, M.R.; Lacerda, J.J.DeJ.; Martins, E.DaC. (2020) Associative diazotrophic bacteria inoculated in sugarcane cultivars: Implications on morphophysiological attributes and plant nutrition. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 44:1–17. DOI: 10.36783/18069657rbcs20190155.

- Lisko, K.A.; Aboobucker, S.I.; Torres, Raquel, L.A. (2014) Engineering elevated vitamin c in plants to improve their nutritional content, growth, and tolerance to abiotic stress. In: Jetter, R. (Ed.) *Phytochemicals – biosynthesis, function and application*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 109–128.
- Liu, M.; Lu, S. (2016) Plastoquinone and Ubiquinone in Plants: Biosynthesis, Physiological Function and Metabolic Engineering. *Frontiers in Plant Science*, 7:1898. DOI: 10.3389/fpls.2016.01898.
- Liu, Y.; Yu, L.; Wang, R. (2011) Level of ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33:1353-1563. DOI: 10.1007/s11738-010-0669-5.
- Llorente, B.E.; Alasia, M.A.; Larraburu, E.E. (2016) Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves in vitro culture of *Handroanthus ochaceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant. *New Biotechnology*, 33: 32-40. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.07.006.
- Loewls, F. A.; Kelly, S. (1961) The metabolism of D-galacturonic ripening and its methyl ester in the detached strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 483–493. DOI: 10.1016/0003-9861(61)90180-1.
- Lorence, A.; Chevone, B.; Mendes, P.; Nessler, C.L. (2004) myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, 134: 1200–1205. DOI: 10.1104/pp.103.033936.
- Masciarelli, O.; Urbani, L.; Reinoso, H.; Luna, V. (2013) Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *Journal of Microbiology*, 51(5): 590–597. DOI: 10.1007/s12275-013-3136-3.
- Matamoros, M.A.; Loscos, J.; Coronado, M.J.; Ramos, J.; Sato, S.; Testillano, P.S.; Tabata, S.; Becana, M. (2006) Biosynthesis of ascorbic acid in legume root nodules. *Plant Physiology*, 141: 1068-1077. DOI: 10.1104/pp.106.081463.
- Matos, I.F.; Morales. L.M.M.; Santana, D.B.; Silva, G.M.C.; Gomes, M.M.A.; Ayub, R.A.; Costa, J.H.; Oliveira, J.G. (2022) Ascorbate synthesis as an alternative

electron source for mitochondrial respiration: Possible implications for the plant performance. *Frontiers in Plant Science*, 13: 987077. DOI: 10.3389/fpls.2022.987077.

Matteo, A.D.; Sacco, A.; Anacleria, M.; Pezzotti, M.; Delledonne, M.; Ferrarini, A.; Frusciante, L.; Barone, A. (2010) The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*, 1: 166. DOI: 10.1186/1471-2229-10-163.

Mccrady, M.H. (1918) Tables for rapid interpretation of fermentation-tube results. *Public Health Journal*, 9:201–220.

McGuire, R.G. (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27: 1254-1255. DOI: 10.21273/HORTSCI.27.12.1254.

Mellidou, I.; Koukounaras, A.; Kostas, S.; Patelou, E.; Kanellis, A.K. (2021) Regulation of vitamin C accumulation for improved tomato fruit quality and alleviation of abiotic stress. *Genes*, 12: 694. DOI: 10.3390/genes12050694.

Millar, A.H.; Mittova, V.; Kiddle, G.; Heazlewood, J.L.; Bartoli, C.G.; Theodoulou, F.L.; Foyer, C.H. (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress response. *Plant Physiology*, 133: 443–447. DOI: 10.1104/pp.103.028399.

Millar, A.H.; Whelan, J.; Soole, K.L.; Day, D.A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 79-104. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103857.

Morales, L.M.M.; Silva, G.M.C.; Santana, D.B.; Pireda, S.F.; Cogo, A.J.D.; Heringer, A.S.; Oliveira, T.R.; Reis, R.S.; Prado, L.A.S.; Oliveira, A.V.; Silveira, V.; Cunha, M.; Barros, C.F.; Façanha, A.R.; Baldet, P.; Bartoli, C.G.; Silva, M.G.; Oliveira, J.G. (2022) Mitochondrial dysfunction associated with ascorbate synthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105:55-68. DOI: 10.1016/j.plaphy.2022.05.025.

Moretti, L.G.; Crusciol, C.A.C; Bossolani, J.W.; Calonego, J.C.; Moreira, A.; Garcia, A.; Momesso, L.; Kuramae, E.E.; Hungria, K. (2021) Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain

yield during short dry spells. *European Journal of Agronomy*, 127(7): 126293. DOI: 10.1016/j.eja.2021.126293.

Murphy, L.J.; Robertson, K.N.; Harroun, S.G.; Brosseau, C.L.; Werner-Zwanziger, U.; Moilanen, J.; Tuononen, H.M.; Clyburne, J.A.C. (2014) A simple complex on the verge of breakdown: Isolation of the elusive cyanoformate ion. *Science*, 344 (6179): 75–78. DOI: 10.1126/science.1250808.

Njus, D.; Kelley, P.M.; Tu, Y.J.; Schlegel, H.B. (2020) Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 159(5): 37–43. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013.

Okla, M.K.; Javed, S.; Tahir, M.F.; Saleh, I.A.; Qadir, A.; Anas, M.; Saleem, M.H.; Ahmed, T.; Alatar, A.A.; Ai Munqeldhi, B.M.; Ali, S. (2026) Enhanced wheat growth and stress resilience under copper toxicity through ZnO–NPs and *Azospirillum brasiliense*. *Kuwait Journal of Science*, 53:100476. DOI: 10.1016/j.kjs.2025.100476.

Oliveira, M.G.; Mazorra, L.M.; Souza, A.F.; Silva, G.M C.; Correa, S. F.; Santos, W.C.; Silva, M.A.P. (2015) Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, 189(17): 42-50. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.10.001.

Olmos, E.; Kiddle, G.; Pellny, T.K.; Kumar, S.; Foyer, C.H. (2006) Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57(8): 1645–1655. DOI: 10.1093/jxb/erl01.

ONU (2021). United Nations Environment Programme. Food Waste Index Report 2021. Nairobi.

ONU (2024). United Nations Environment Programme. Food Waste Index Report 2024. Nairobi.

Paciolla, C.; Fortunato, S.; Dipierro, N.; Paradiso, A.; Leonardis, S. De; Mastropasqua, L.; Pinto, M.C.D. (2019) Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants*, 8(11): 519. DOI: 10.3390/antiox8110519.

- Palheta, J.G.; Okumura, R.S.; Albuquerque, G.D.P.; De Sousa, D.J.P.; Teixeira, J.S.S.; Neves, M.G.; Filho, W.R.I.L.; De Souza, L.C., Neto, C.O. (2021) Sources and doses of nitrogen associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* modulate growth and gas exchange of corn in the brazilian amazon. *International Journal of Agriculture and Biology*, 26: 349-358. DOI: 10.17957/IJAB/15.1843.
- Pateraki, I.; Sanmartin, M.; Kalamaki, M. S.; Gerasopoulos, D.; Kanellis, A. K. (2004) Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany*, 55(403): 1623–1633. DOI: 10.1093/jxb/erh186.
- Pathania, P.; Rajta, A.; Singh, P.C.; Bhatia, R. (2020) Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30(10): 101842. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101842.
- Pedraza, R.O.; Filippone, M.P.; Fontana, C.; Salazar, S.M.; Ramírez-Mata, A.; Sierra-Cacho, D.; Baca, B.E. (2020) *Azospirillum*. In: Amaresan, N.; Kumar, M.S.; Annapurna, K.; Kumar, K.; Sankaranarayanan, A. (Eds.). *Beneficial microbes in agro-ecology*. 1. ed. New York: Academic Press, p. 73–106.
- Pereg, L.; De-Bashan, L.E.; Bashan, Y. (2016) Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*, 399: 389–414. DOI: 10.1007/s11104-015-2778-9.
- Pineau, B.; Layoune, O.; Danon, A.; Paepe, R.De. (2008) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47): 32500–32505. DOI: 10.1074/jbc.M805320200.
- Pinto, M.C. De; Francis, D.; Gara, L. De. (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 209: 90–97. DOI: 10.1007/BF01415704.
- Pinto, M.C. De; Gara, L. De. (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*, 55(408): 2559–2569. DOI: 10.1093/jxb/erh253.

Pozo, M.J.; Zabalgogeazcoa, I.; Vazquez De Aldana, B.R.; Martinez-Medina, A. (2021) Untapping the potential of plant microbiomes for applications in agriculture. *Current Opinion in Plant Biology*, 60: 102034. DOI: 10.1016/j.pbi.2021.102034.

Pravst, I.; Zmitok, K.; Zmitok, J. (2014) Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50:269-280. DOI: 10.1080/10408390902773037.

Puente, M.E.; Li, C.Y.; Bashan, Y. (2004) Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology*, 6(5): 643-650. DOI: 10.1055/s-2004-821101.

Raffi, M.M.; Charyulu, P.B.B.N. (2021) *Azospirillum*-biofertilizer for sustainable cereal crop production: current status. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 2: 193-209. DOI: 10.1016/B978-0-12-821406-0.00018-7.

Reddy, P.P. (2014) *Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection*. 1ed. India: Springer.

Repke, R.A.; Cruz, S.J.S.; Silva, C.J.; Figueiredo, P.G.; Bicudo, S.J. (2013) Eficiência da *Azospirillum brasiliense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 12(3): 214–226. DOI: 10.18512/1980-6477/rbms.v12n3p214-226.

Rodríguez-Ruiz, M.; Mateos, R.M.; Codesido, V.; Corpas, F.J.; Palma, J.M. (2017) Characterization of the galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biology*, 12(12):171–181. DOI: 10.1016/j.redox.2017.02.009.

Roriz, M.; Carvalho, S.M.P.; Castro, P.M.L.; Vasconcelos, M.W. (2020) Legume biofortification and the role of plant growth-promoting bacteria in a sustainable agricultural era. *Agronomy*, 10(3):435. DOI: doi.org/10.3390/agronomy10030435.

Roth, K.; Streller, S. (2009) Vitamin C deficiency. *Chemie in Unserer Zeit*, 43: 38-54, 2009. DOI: 10.1002/ciuz.200900481.

Rozier, C.; Gerin, F.; Czarnes, S.; Legendre, L. (2019) Bioprimer of maize germination by the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum lipoferum*

CRT1. *Journal of Plant Physiology*, 237: 111-119. DOI: 10.1016/j.jplph.2019.04.011.

Ruiz-Sánchez, M.; Armada, E.; Muñoz, Y.; Salamone, I.E.G.; Aroca, R.; Ruiz-Lozano, J.M.; Azcón, R. (2011) *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 168:1031-1037. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.12.019.

Saga, G.; Giorgetti, A.; Fufezan, C.; Giacometti, G.M.; Bassi, R.; Morosinotto, T. (2010) Mutation analysis of violaxanthin de-epoxidase identifies substrate-binding sites and residues involved in catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31): 23763–23770. DOI: 10.1074/jbc.M110.115097.

Saha, B.; Borovskii, G.; Panda, S.K. (2016) Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signaling e Behavior* 11(12): e1256530. DOI: 10.1080/15592324.2016.1256530.

Sahoo, R.K.; Ansari, M.W.; Pradhan, M.; Dangar, T.K.; Mohanty, S.; Tuteja, N. (2014) Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma* 251:943–953. DOI: 10.1007/s00709-013-0607-7.

Salazar-Garcia, G.; Balaguera-Lopez, H.E.; Hernandez, J.P. (2022) Effect of plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasiliense* on the physiology of radish (*Raphanus sativus* L.) under waterlogging stress. *Agronomy*, 12(3): 726. DOI: 10.3390/agronomy12030726.

Santana, D.B. (2019) Transporte de elétrons via L-galactono-1,4-lactona respiração mitocondrial em frutos. Tese de Doutorado. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual Do Norte Fluminense.

Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; Antonius, S. (Eds.) (2019) *Plant growth promoting rhizobacteria: potential microbes for sustainable agriculture*. 1. ed. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd.

Schertl, P.; Sunderhaus, S.; Klodmann, J.; Gergoff Grozeff, G.E.; Bartoli, C.G.; Braun, H.P. (2012) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of

thee subcomplexes of mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18): 14412–14419. DOI: 10.1074/jbc.M111.305144.

Schimmeyer, J.; Bock, R.; Meyer, E.H. (2016) L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 90: 117–126. DOI: 10.1007/s11103-015-0400-4.

Silva, G.M.C.; Morales, L.L.M.; Santana, D.B.; Santa-Catarina, C.; Oliveira, J.G. (2024) The alternative respiration is linked with the ascorbate synthesis capacity in climacteric and non-climacteric fruit mitochondria. *Postharvest Biology and Technology*, 2010: 112780. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2024.112780.

Smirnoff, N. (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: a comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122: 116–129. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033.

Smirnoff, N.; Conklin, P.L.; Loewus, F.A. (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1): 437–467. DOI: 10.1146/annurev.arplant.52.1.437.

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. (2015) Auxin signaling in *Azospirillum brasilense*: a proteome analysis. In: *de Bruijn FJ (ed) Biological nitrogen fixation*. Wiley 937–940.

Stasolla, C.; Belmonte, M.F.; Tahir, M.; Elhiti, M.; Khamiss, K.; Joosen, R.; Maliepaard, C.; Sharpe, A.; Gjetvaj, B.; Boutilier, K. (2008) Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta*, 228(2): 255–272. DOI: 10.1007/s00425-008-0735-z.

Stasolla, C.; Yeung, E.C. (2001) Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum*, 111(2): 196–205. DOI: 10.1007/s11627-999-0041-x.

Stasolla, C.; Yeung, E.C. (2007) Cellular ascorbic acid regulates the activity of major peroxidases in the apical poles of germinating white spruce (*Picea glauca*)

somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 188–198. DOI: 10.1016/j.plaphy.2007.02.007.

Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (4): 487–506. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x.

Strzelczyk, E.; Kampert, M.; Li, C.Y. (1994) Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbono sources. *Microbiology Research* 149: 55–60. DOI: 10.1016/S0944-5013(11)80136-9.

Svirbely, J.L.; Szent-Györgyi, A. (1932) The chemical nature of vitamin. *Biochemistry*, 26(3): 865-870. PMID: 16745082.

Swedrzynska, D. (2000) Effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environment Studies*, 9 (5): 423–428.

Szarka, A.; Bánhegyi, G.; Ard, H. (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9): 1036–1044 DOI: 10.1089/ars.2012.5059.

Tarrand, J.J.; Krieg, N.R.; Dobereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum gen. nov.* and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) and *Azospirillum brasiliense*. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8): 967–980. DOI: 10.1139/m78-160.

Tien, T.; Gaskins, M.; Hubbell, D. (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of pearl millet. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5): 1016–1024. DOI: 10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979.

Tokunaga, T.; Miyahara, K.; Tabata, K.; Esaka, M. (2005) Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*, 220: 845-863. DOI: 10.1007/s00425-004-1406-3.

- Tsukanova, K.A.; Chebotar, V.K.; Meyer, J.J.M.; Bibikiva, T.N. (2017) Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, 113: 91-102. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.07.007.
- Tyburski, J.; Dunajska-Ordak, K.; Skorupa, M.; Tretyn, A. (2012) Role of ascorbate in the regulation of the *Arabidopsis thaliana* root growth by phosphate availability. *Journal of Botany*, 2012: 1–11. DOI: 10.1155/2012/580342.
- Upadhyay, S.K.; Singh, J.S.; Saxena, A.K.; Singh, D.P. (2012) Impact of PGPR inoculation on growth and antioxidant status of wheat under saline conditions. *Plant Biology*, 14(4): 605–611. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00533.x.
- Urrea-Valencia, S.; Etto, R.M.; Takahashi, W.Y.; Caires, E.F.; Bini, A.R.; Ayub, R.A.; Stets, M.I.; Cruz, L.M.; Galvão, C.W. (2020). Detection of Azospirillum brasilense by qPCR throughout a maize field trial. *Applied Soil Ecology*, 160: 103849. DOI: 10.1016/j.apsoil.2020.103849.
- Valandro, F.; Menguer, P.K.; Cabreira-Cagliari, C.; Margis-Pinheiro, M.; Cagliari, A. (2020) Programmed cell death (PCD) control in plants: new insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome. *Plant Science*, 299(7): 110603. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110603.
- Vanlerberghe, G.C. (2013) Alternative Oxidase: A mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Science*, 14: 6805-6847. DOI: 10.3390/ijms14046805.
- Ververidis, P.; John, P. (1991) Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*, 30(3): 725–727. DOI: 10.1016/0031-9422(91)85241-Q.
- Wani, S.P.; Gopalakrishnan, S. (2019) Plant growth-promoting microbes for sustainable agriculture. In: Sayyed, R.Z.; Reddy, M.S.; Antonius, S. (Eds.). *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for sustainable agriculture*. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd, p. 19–45.

- Weng, L.; Bai, X.; Zhao, F.; Li, R.; Xiao, H. (2016) Manipulation of flowering time and branching by overexpression of the tomato transcription factor SIZFP2. *Plant Biotechnology Journal*, 14(12): 2310–2321. DOI: 10.1111/pbi.12584.
- Wheeler, G.; Jones, M.; Smirnoff, N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393: 365–369. DOI: 10.1038/30728.
- Xu, F.; Yuan, S.; Zhang, D.; Lv, X.; Lin, H. (2012) The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, 15: 5706-5716. DOI: 10.1093/jxb/ers226.
- Xu, Q.; Pan, W.; Zhang, R.; Lu, Q.; Xue, W.; Wu, C.; Song, B.; Du, S. (2018) Inoculation with *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* produces abscisic acid that reduces *irt1*-mediated cadmium uptake of roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20): 5229–5236. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b00598.
- Yamamoto, Y.; Kobayashi, Y.; Devi, S.R.; Rikiishi, S.; Matsumoto, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 128(1): 63–72. PMID: 11788753.
- Ye, N.; Zhu, G.; Liu, Y.; Zhang, A.; Li, Y.; Liu, R.; Shi, L.; Jia, L.; Zhang, J. (2012) Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*, 63(5): 1809–1822. DOI: 10.1093/jxb/err336.
- Yu, L.; Gao, B.; Li, Y.; Tan, W.; Li, M.; Zhou, L.; Peng, C.; Xiao, L.; Liu, Y. (2020) The synthesis of strigolactone is affected by endogenous ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase suppressed or overexpressing. *Journal of Plant Physiology*, 246(8): 153139. DOI: 10.1016/j.jplph.2020.153139.
- Yu, L.; Liu, Y.; Lu, L.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Zhou, L.; Chen, H.; Peng, C. (2017) Ascorbic acid deficiency leads to increased grain chalkiness in transgenic rice for suppressed of L-GaLDH. *Journal of Plant Physiology*, 211: 13–26. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.11.017.

Yu, L.; Liu, Y.; Tong, J.; Ding, J. Wang, R.; Peng, C.; Xiao, L. (2015) Reduced grain chalkiness and its possible physiological mechanism in transgenic rice overexpressing L-GaLDH. *Crop Journal*, 1:125-134. DOI: 10.1016/j.cj.2014.12.001.

Zhang, Q.L.; Wei, Y.X.; Peng, C.L. (2018) Effects of endogenous ascorbic acid on resistance to high-temperature stress in excised rice leaves. *Photosynthetica*, 56: 1453-1458. DOI: 10.1007/s11099-018-0836-2.

Zheng, X.T.; Yu, Z.C.; Chen, X.F.; Cai, M.L.; Wang, Y.Z.; Peng, C.L. (2020) Endogenous ascorbic acid delays ethylene-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthetica*, 58: 720-731. DOI: 10.32615/ps.2020.028.

Zheng, X.T.; Zhang, X. H.; Wang, Y.Z.; Cai, M.L.; Li, M.; Zhang, T.J.; Peng, C.L. (2019) Identification of a GLDH-overexpressing arabidopsis mutant and its responses to high-light stress. *Photosynthetica*, 57: 332-341. DOI: 10.32615/ps.2019.038.

## APÊNDICE

Tabela Suplementar 1: Primers utilizados no RT-qPCR referente aos genes de interesse

<b>Gene</b>	<b>Primers</b>
Ubiquitin3_F	GGTTGATGACACTGGAAAGGTT
Ubiquitin3_R	ATCGCCTCCAGCCTTGTGTA
LGALDH_F	TGGTTGGTTACGTCAACTCTTA
LGALDH_R	CCTTCAACTAACATTCTGAACAA
AOX1a_F	TTGGCTCATCGTATCGTCGG
AOX1a_R	GCCCCAACACCAAGACAAC
AOX1b-Q_F	GGCGTATTGTCAATGCCTATT
AOX1b-Q_R	GAAGCAAAGTGATTAGGTCCC
AOX1c-Q_F	CCAAAATTGGCACATCGAATTG
AOX1c-Q_R	CATCTTAAGAGTCGCGTCTTG
AOX2-Q_F	GTAACGGTTGCATATCGTCTTC
AOX2-Q_R	GAGGACTTCGTTGAATTCTCG

Tabela Suplementar 2: Valores de p para expressão relativa de diferentes genes para o genótipo WT comparado com o genótipo 8-14 em raiz, folha e fruto

Tecido	Gene	Valor de p	Significância
<b>Raiz</b>	AOX1a	0,049	*
	AOX1b	0,045	*
	AOX1c	0,003	**
	AOX2	0,07	ns
	Ubiquinona	0,03	*
	L-GaILDH	0,027	*
<b>Folha</b>	AOX1a	0,029	*
	AOX1b	0,031	*
	AOX1c	0,032	*
	AOX2	0,298	ns
	Ubiquinona	0,012	*
	L-GaILDH	0,007	**
<b>Fruto Maduro</b>	AOX1a	0,033	*
	AOX1b	0,835	ns
	AOX1c	0,602	ns
	AOX2	0,858	ns
	Ubiquinona	0,255	ns
	L-GaILDH	0,041	*

Tabela Suplementar 3: Valores de p para expressão relativa dos genes de raiz de tomateiro

<b>Gene</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Significância</b>
AOX1a	WT	Controle X Inoculado	0,051	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,050	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,010	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,068	ns
AOX1b	WT	Controle X Inoculado	0,030	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,030	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,050	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,003	**
AOX1c	WT	Controle X Inoculado	0,030	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,033	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,028	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,0005	***
AOX2	WT	Controle X Inoculado	0,090	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,082	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,059	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,031	*
Ubiquinona	WT	Controle X Inoculado	0,019	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,021	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,014	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,200	ns
L-GaILDH	WT	Controle X Inoculado	0,046	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,030	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,010	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,009	**

ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de t de student em 5% de probabilidade. \*: indica significância ( $p<0,05$ ). \*\*: indica significância ( $p<0,01$ ). \*\*\* indica significância ( $P<0,001$ ).

Tabela Suplementar 4: Valores de p para expressão relativa dos genes de folha de tomateiro

<b>Gene</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Significância</b>
AOX1a	WT	Controle X Inoculado	0,017	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,054	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,002	**
	8-14	Controle X Coinoculado	0,089	ns
AOX1b	WT	Controle X Inoculado	0,141	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,582	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,397	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,009	***
AOX1c	WT	Controle X Inoculado	0,173	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,042	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,030	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,033	*
AOX2	WT	Controle X Inoculado	0,053	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,008	***
	8-14	Controle X Inoculado	0,154	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,091	ns
Ubiquinona	WT	Controle X Inoculado	0,053	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,048	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,006	**
	8-14	Controle X Coinoculado	0,007	**
L-GalLDH	WT	Controle X Inoculado	0,057	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,034	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,004	***
	8-14	Controle X Coinoculado	0,004	***

ns: indica que não houve significância estatística pelo teste de t de student em 5% de probabilidade. \*: indica significância ( $p<0,05$ ). \*\*: indica significância ( $p<0,01$ ). \*\*\* indica significância ( $P<0,001$ ).

Tabela Suplementar 5: Valores de p para expressão relativa dos genes de fruto maduro de tomate

<b>Gene</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Comparação</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Significativo (&gt;0,05)</b>
AOX1a	WT	Controle X Inoculado	0,012	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,002	**
	8-14	Controle X Inoculado	0,088	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,147	ns
AOX1b	WT	Controle X Inoculado	0,061	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,063	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,422	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,451	ns
AOX1c	WT	Controle X Inoculado	0,708	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,107	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,355	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,210	ns
AOX2	WT	Controle X Inoculado	0,070	ns
	WT	Controle X Coinoculado	0,020	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,080	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,080	ns
Ubiquinona	WT	Controle X Inoculado	0,010	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,040	*
	8-14	Controle X Inoculado	0,010	*
	8-14	Controle X Coinoculado	0,002	**
L-GaLDH	WT	Controle X Inoculado	0,014	*
	WT	Controle X Coinoculado	0,232	ns
	8-14	Controle X Inoculado	0,791	ns
	8-14	Controle X Coinoculado	0,790	ns