

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INTERAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ (*Oryza
sativa* L.) SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR
(AVP1OX)

LUANA MOTA PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INTERAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ (*Oryza
sativa* L.) SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR
(AVP1OX)

LUANA MOTA PEREIRA

“Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P436

Pereira, Luana Mota.

Aspectos ecofisiológicos e morfológicos da interação entre espécies de fungos micorrízicos arbusculares e plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa* L.) super-expressando a H⁺-PPase vacuolar (AVP1OX) / Luana Mota Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

58 f. : il.

Bibliografia: 39 - 45.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Alessandro Coutinho Ramos.

1. Fungo micorrízico arbuscular. 2. H⁺-pirofosfatase . 3. Agricultura sustentável. 4. Plantas WT. 5. Plantas AVP1OX. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA
INTERAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ
(*Oryza sativa* L.) SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase
VACUOLAR (AVP1OX)

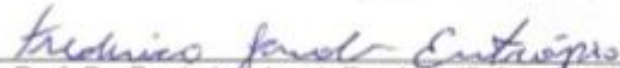
LUANA MOTA PEREIRA

"Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal".

Aprovada em 17 de fevereiro de 2020


Comissão Examinadora:


Dr.^a Amanda Azevedo Bertolazi (D.Sc., Produção Vegetal) – UVV


Prof. Dr. Frederico Jacob Eutrópio (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) – IFES


Dr. Cesar Abel Krohling (D.Sc., Ecologia de Ecossistemas) – INCAPER


Prof. Dr. João Carlos de Aquino Almeida (D.Sc., Ciências Biológicas) – UENF


Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UVV
Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais, que investiram na minha formação, por apoiarem e respeitarem as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre me guiando e me protegendo.

A minha mãe Angela Maria Mota Pereira e meu pai Olivaldo Alves Pereira (em memória), por sempre investirem nos meus estudos, acreditarem, incentivarem e confiarem em mim, essa vitória é nossa.

A toda minha família por todo incentivo, em especial as minhas tias Rozely, Rosane, Beatriz, Jandira e Fátima.

Ao meu namorado Robson Nogueira pelo companheirismo, amor, incentivo e por toda ajuda.

Ao meu orientador professor Alessandro Coutinho Ramos, pela orientação e pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim para conduzir este trabalho e por toda ajuda nos momentos que mais precisei.

Ao meu coorientador, professor João Carlos de Aquino Almeida, pela orientação e excelente acolhimento no seu grupo de pesquisa desde a minha graduação, sou muito grata, pois com o senhor descobri o deslumbrante mundo da microscopia, pelo qual me apaixonei. Pela confiança, incentivo, amizade e disponibilidade de me ajudar, sempre quando foi preciso, e por todos os ensinamentos e conhecimentos que adquirir com você.

Ao Sávio Bastos de Souza, por todos os conhecimentos e ensinamentos passados que contribuíram muito para minha formação, e para a realização deste

trabalho, por sempre estar presente e ajudar em todos os momentos que precisei, pelos conselhos e amizade.

À Amanda Bertolazi pelo contato que tive, quando você ainda estava na UENF, foi uma pessoa excelente e maravilhosa nos momentos que eu precisei, sanou minhas dúvidas, me ajudou a compreender o artigo da disciplina relação solo e planta.

Às técnicas do LBCT – Setor de preparo de amostras para microscopia, Beatriz Ribeiro e Giovana Alves pela disponibilidade de ajudarem, sempre quando foi preciso, pelos os conhecimentos e pela alegria contagiante que vocês transmitem, e a todos os demais funcionários pelo auxílio.

Aos técnicos do LFBM, Luíz, Valéria, Zila e Noil pelo trabalho e dedicação.

À Kíssila Soares e Bianca do Carmo pelo companheirismo, ajuda e por todos os conhecimentos que compartilhamos juntas.

À Laura Maciel, pelos muitos conhecimentos adquiridos na época da graduação e agora, mesmo de longe, sempre disposta a ajudar e me incentivar.

Às amigas que a UENF me deu desde a graduação Kíssila Soares e Jussara Silva por todo apoio, conselhos, tristezas e alegrias que compartilhamos juntas e por nunca me deixarem desistir.

Às novas amigas Bianca do Carmo, Giovanna Campos, Daiane Baia, Gabriella Rodrigues, Richardson Sales, Isabelle Faria, Jarbas Cisino e Bruna Ponciano, amei conhecer vocês nessa fase da pós-graduação, obrigada pela amizade, pelo compartilhamento de conhecimentos e incentivos.

A todos os professores que tive ao longo dessa trajetória e que contribuíram para a minha formação.

À UENF e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela estrutura e concessão de bolsas.

À banca examinadora Amanda Azevedo Bertolazi, Frederico Jacob Eutrópio e Cesar Abel Krohling, que prontamente aceitaram o convite de participarem da defesa deste trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e para minha formação, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Arroz	4
2.2. Micorrizas.....	6
2.3. Plantas AVP1OX	10
2.4. As interações das plantas geneticamente modificadas com os microrganismos do solo	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Obtenção das sementes, condições de crescimento e inoculação das plantas de <i>Oryza sativa</i>	15
4.2. Obtenção do fungo micorrízico arbuscular e parâmetros de crescimento das plantas.....	16
4.3. Determinação da taxa de colonização micorrízica.....	16
4.4. Trocas gasosas.....	17
4.5. Microscopia óptica - (MO)	17
4.6. Análise estatística dos dados	18
5. RESULTADOS	19

5.1- Respostas no Crescimento.....	19
5.2 - Porcentagem de Colonização Micorrízica.....	23
5.3 - Assimilação de Carbono e Eficiência no Uso da Água.....	28
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

PEREIRA, Luana Mota. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2020. ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E MORFOLÓGICOS DA INTERAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E PLANTAS TRANSGÊNICAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) SUPER-EXPRESSANDO A H⁺-PPase VACUOLAR (AVP1OX). Orientador: Prof. Alessandro Coutinho Ramos. Coorientador: Prof. João Carlos de Aquino Almeida.

O uso de fungos promotores do crescimento vegetal é uma estratégia no desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Plantas transgênicas que super-expressam o gene AVP1 que codifica a H⁺-pirofosfatase vacuolar induzem respostas similares àquelas desencadeadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Logo, a utilização de plantas AVP1OX inoculadas com os FMAs pode gerar diversos benefícios, como maior produtividade, via aumento na absorção de nutrientes, e tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Porém, sabe-se pouco sobre a especificidade dos FMAs e do impacto que as plantas transgênicas podem ter na rizosfera e na função destes microrganismos do solo. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo analisar microscopicamente o processo de colonização de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) selvagem e AVP1OX pelos FMAs *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana*, *Claroideoglossum etunicatum*, e correlacionar as alterações ultraestruturais ao nível celular com as mudanças ecofisiológicas, através da análise de parâmetros de crescimento e fotossintéticos. Aos 90 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e foram avaliados: a altura e o peso seco da parte aérea; o diâmetro do caule; o comprimento, o volume e o peso seco da raiz; os parâmetros fotossintéticos e as

alterações ultraestruturais. Nas micrografias observou-se a colonização e a formação de arbúsculos e vesículas. Plantas selvagens (WT) inoculadas com os três FMAs apresentaram aumentos tanto nos parâmetros de crescimento quanto nos fotossintéticos, em comparação ao respectivo controle. Já as plantas de arroz AVP1OX apresentaram maior aumento no parâmetro de crescimento, maior taxa fotossintética e eficiência no uso da água em relação as plantas WT, porém, quando inoculadas com o FMA *Rhizophagus clarus* estas plantas apresentaram inibições nesses parâmetros fotossintéticos. Já nos demais FMAs não houve impacto sobre esses parâmetros. Concluiu-se que as interações simbióticas podem promover o crescimento e o desempenho fotossintético das plantas WT, mas principalmente das plantas AVP1OX, que foram mais eficientes quando comparadas às plantas WT. Entretanto, quando inoculadas com o FMA *R. clarus*, as plantas AVP1OX demonstraram que espécies diferentes de FMAs promovem respostas distintas em plantas de arroz, existindo graus de especificidade para cada fungo, sendo necessários, portanto, estudos complementares.

ABSTRACT

PEREIRA, Luana Mota. State University of the North Fluminense Darcy Ribeiro. February 2020. ECOPHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE INTERACTION BETWEEN SPECIES OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND TRANSGENIC RICE PLANTS (*Oryza sativa* L.) SUPER EXPRESSING H⁺-PPase VACUOLAR (AVP1OX). Advisor: Prof. Alessandro Coutinho Ramos. Co-advisor: Prof. João Carlos de Aquino Almeida.

The use of fungi that promote plant growth is an important strategy for the development of sustainable agriculture. Transgenic plants with overexpression of the AVP1 gene, which encodes the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, induce similar responses to those promoted by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Therefore, the use of AVP1OX plants inoculated with AMF can generate several benefits, such as increased productivity through increased nutrient uptake and tolerance to biotic and abiotic stresses. However, little is known about the specificity of AMF, the impact that transgenic plants may have on the rhizosphere and the function of these soil microorganisms. Thus, the objective of this work was to analyze microscopically the colonization process of wild-type (WT) rice (*Oryza sativa* L.) and transgenic (AVP1OX) rice by the AMF *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana*, *Claroideoglossum etunicatum* and to correlate ultra-structural changes at the cellular level with the ecophysiological changes, through the analysis of growth and photosynthetic parameters. At 90 days after inoculation, the plants were collected and the following were evaluated: height and dry weight of the aerial part; the diameter of the stem; the length, volume and dry weight of the root; photosynthetic parameters and ultrastructural changes. Mycorrhizal colonization with arbuscules and vesicles formation were observed in the micrographs. WT rice plants inoculated with the three AMF, showed increased growth and photosynthetic parameters compared to control. The AVP1OX rice plants showed greater increase in the growth parameter had higher photosynthetic rate and water use efficiency in relation to WT plants, but when inoculated with the *Rhizophagus clarus*, these plants showed lower photosynthetic parameters. In the other FMAs, however, there was no impact on these parameters. We concluded that the symbiotic interactions can promote the growth and photosynthetic performance of WT plants and mainly of AVP1OX plants, which were more efficient when

compared with WT plants, except when inoculated with FMA *R. clarus*, demonstrating that different species of FMAs promote different responses in rice plants, with degrees of specificity for each fungus, requiring further studies.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos fundamentais para aproximadamente metade da população mundial, sendo responsável por oferecer mais de 20% do consumo de calorias na dieta diária da população em diversos países. Por este motivo, a demanda por este alimento torna-se cada vez maior, principalmente devido ao aumento populacional ocorrido nas últimas décadas (Kubo e Purevdorj, 2004; Vallino et al., 2014).

Estima-se que o planeta abrigará aproximadamente 9 bilhões de pessoas em 2050, o que acarretará um aumento de 60% na demanda por alimentos, principalmente de cereais como o arroz que representam grande parte da base alimentar em muitos países (ONU, 2016). Consequentemente, para aumentar a produção destes cereais, a agricultura convencional tem utilizado excessivamente fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos, além de defensivos agrícolas, resultando em danos ambientais e sociais (Duvick, 2005; Montaña et al., 2014). Nessa circunstância, a busca por novas estratégias sustentáveis, que possibilitem a redução dos danos ambientais causados pela atividade agrícola, torna-se imprescindível para preservação dos ecossistemas e da biodiversidade (Montaña et al., 2014).

Existem diversas alternativas já descritas na literatura para esta problemática, dentre as quais pode-se destacar a utilização de fungos promotores do crescimento vegetal como a associação micorrízica, que promove o aumento da produtividade através de uma melhoria na capacidade da planta de absorver nutrientes do solo e tolerar estresses bióticos e abióticos (Zuccaro et al., 2014;

Wang et al., 2015; Bernaola et al., 2018). Outra estratégia propícia seria o uso de plantas transgênicas como, por exemplo, aquelas que super-expressam o gene AVP1, que codifica a H⁺-pirofosfatase vacuolar, conhecida por promover o aumento na capacidade de absorção de nutrientes e a capacidade das plantas em tolerarem possíveis estresses (Gaxiola et al., 2001; Zhao et al., 2006; Pasapula et al., 2011).

As micorrizas arbusculares são associações simbióticas mutualistas formadas entre fungos do Filo Glomeromycota e raízes da maioria das plantas terrestres, compreendendo culturas agrícolas (Bernaola et al., 2018). Nesta associação, a planta hospedeira fornece ao fungo carbono orgânico derivado do processo fotossintético e, em troca, este oferece nutrientes minerais, principalmente o fosfato inorgânico para a planta (Kobae e Hata., 2010; Bravo et al., 2017).

O fungo micorrízico arbuscular (FMA) também proporciona tolerância a estresses, além do controle contra patógenos, contribuindo para o desenvolvimento da planta hospedeira e aumentando a sua produtividade (Genre et al., 2005; Smith e Read, 2008; Zuccaro et al., 2014; Jeong et al., 2015; Bernaola et al., 2018). De maneira geral, os FMAs não apresentam especificidade, pois colonizam raízes de diferentes espécies. Entretanto, alguns estudos demonstraram que a simbiose micorrízica arbuscular pode apresentar um certo grau de especificidade, porém, ainda não se sabe o motivo pelo qual isso acontece (Smith e Read, 1997; Vandenkoornhuysen et al., 2002; Chitarra et al., 2016).

A manipulação genética da bomba de prótons pirofosfatase (H⁺-PPase) é uma alternativa promissora para o aumento da produtividade de várias culturas de importância econômica (Gaxiola et al., 2001; Park et al., 2005; Gaxiola et al., 2007). Gaxiola et al. (2001) mostraram que plantas transgênicas de *Arabidopsis* que super-expressavam o gene AVP1, que codifica a H⁺-pirofosfatase vacuolar (H⁺-PPase), apresentavam tolerância à seca e à salinidade. Também foi demonstrado que estas plantas apresentavam um sistema radicular mais volumoso, o que propiciava um aumento na capacidade de absorção de água e nutrientes, explicando em parte, porque essas plantas apresentam maior crescimento e produtividade, tanto em arroz, quanto em tomate e algodão (Park et al., 2005; Zhao et al., 2006; Pasapula et al., 2011).

Assim, a utilização de plantas AVP1OX inoculadas com os FMAs pode gerar diversos benefícios, como maior produtividade via aumento na absorção de nutrientes e tolerância aos estresses bióticos e abióticos. Entretanto, existem estudos que alertam para o uso de plantas geneticamente modificadas, em relação ao impacto que elas podem provocar nos processos da microbiota do solo, principalmente na região da rizosfera (Dunfield e Germida, 2004; Guan et al., 2016). Porém, existem pouquíssimas evidências em relação ao uso de plantas AVP1OX e o possível impacto que elas podem promover na assembleia de microrganismos do solo, principalmente em relação à associação com FMAs e seu processo de colonização.

Diante disso, a hipótese desse estudo é que espécies diferentes de FMAs promovem respostas distintas em plantas de arroz, existindo graus de especificidade para cada fungo, assim como quando inoculadas em plantas transgênicas AVP1OX, em que a transgenia promove respostas diferenciais tanto no processo de colonização, quanto na eficiência da promoção do crescimento e na fotossíntese das plantas pelos FMAs. Nesta dissertação, estudamos o processo de colonização de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) WT e AVP1OX pelos FMAs *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana*, *Claroideoglossum etunicatum*, e os seus respectivos efeitos sobre as respostas morfológicas e ecofisiológicas das plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta herbácea, incluída na classe das Monocotiledôneas, ordem Poales, família Poaceae (Nagata et al., 2016). Este cereal é essencial para os indivíduos, por oferecer necessidades calóricas diárias significativas e, conseqüentemente, tem uma função crucial na sociedade e na economia mundial (Sweeney e McCouch, 2007; Vallino et al., 2014). A China é o maior produtor de arroz mundial e o pioneiro no cultivo de arroz híbrido (FAO, 2017). No Brasil, o maior produtor é o estado do Rio Grande do Sul (Conab, 2018).

Predominante na Região Sul, o ecossistema de várzeas destaca-se pela influência do cultivo irrigado extensivo, desempenhado por grandes e médios produtores, sendo conduzida em forma de rotação alternada com pastagem. Por outro lado, no ecossistema de terras altas, chamados sistema de sequeiro, o cultivo do arroz ocorre em solos drenados, onde pode ter uma irrigação suplementar por aspersão, ou simplesmente ser dependente das condições climáticas como a ocorrência de chuva (Grist, 1986; Embrapa, 2018).

A relação do sistema radicular com o solo é de extrema importância, pois é através das raízes que ocorre a absorção de água e de nutrientes do solo, proporcionando a sobrevivência e perpetuação das plantas. Entender a arquitetura do sistema radicular é de grande interesse, principalmente em ambientes com escassez de nutrientes (Ahmadi et al., 2014).

O sistema radicular do arroz (Figura 1) é formado no decorrer da embriogênese, através da diferenciação de meristemas apicais da raiz, originando a radícula, que é a primeira raiz a se desenvolver no decorrer da germinação e, em seguida, surgem do nódulo do coleótilo, cinco raízes embrionárias da coroa. As raízes posteriores da coroa pós-embriônica diferenciam-se dos perfilhos e dos nós do caule principal. Dois tipos de raízes secundárias são geradas através da ramificação das raízes da radícula e da coroa, são elas: raízes laterais grandes, apresentando gravitropismo positivo, com crescimento indeterminado e com raízes laterais grandes ou pequenas até a quinta ordem de ramificação, e; raízes laterais finas, que são curtas, não reagem à gravidade, com crescimento determinado, nunca produzem ordens superiores de ramificação e são mais abundantes (Coudert et al., 2010).

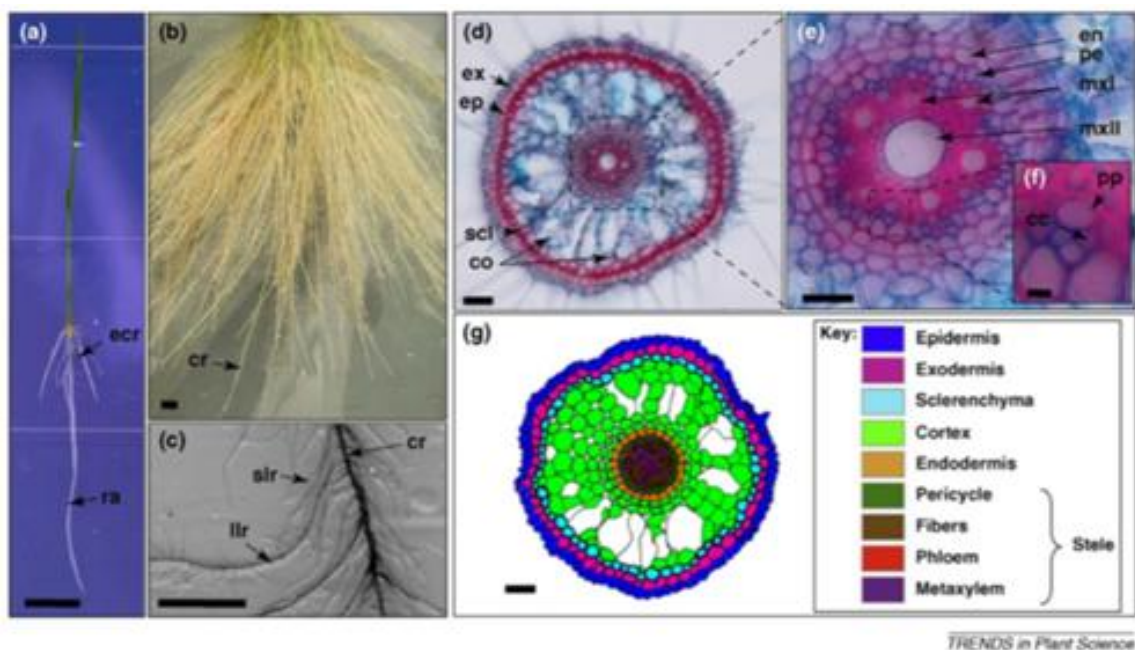


Figura 1. Arquitetura e anatomia da raiz do arroz. (a) sistema radicular de mudas (cultivar nipponbare) 1 semana após a germinação. (b) sistema radicular 40 dias após a germinação. (c) detalhe de uma raiz de coroa. (d) secção transversal de uma radícula, a aproximadamente 2 cm da ponta da raiz. As ligninas são coradas em vermelho e a celulose é manchada em azul. (e) ampliação do feixe radicular. (f) detalhe do floema. (g) uma representação esquemática da organização transversal da radícula. abreviaturas: cc: célula companheira; co: córtex; cr: raiz da coroa; ecr: raiz da coroa embrionária; ep: epiderme; en: endoderme; ex: exoderme; llr: raiz lateral grande; pe: periciclo; mxl: metaxilema primário; mxii: metaxilema secundário; pp: protofloema; ra: radícula; scl: esclerênquima; slr: raiz lateral pequena (Coudert et al., 2010).

Além da planta e dos atributos físicos e químicos do solo, as relações biológicas são fatores fundamentais para aumentar a produtividade e a qualidade da colheita de arroz, pois, por intermédio das associações micorrízicas, por exemplo, é possível diminuir a aplicação de fertilizantes (Wang et al., 2015). Gutjahr et al. (2009) observaram que as raízes laterais grandes de plantas de arroz foram colonizadas pelo fungo micorrízico arbuscular *G intraradices*, e apresentaram hifas, arbúsculos e vesículas, que são estruturas típicas desse tipo de associação. Por outro lado, as raízes laterais finas não foram colonizadas por esse fungo, incluindo ausência de hifopódios, mostrando-se resistentes à simbiose. Porém, os determinantes que tornam as raízes laterais finas não suscetível à colonização por FMA não foram elucidados.

Diante desse quadro, a agricultura precisa de estratégias sustentáveis que não agridam o meio ambiente e que mantenham a produtividade da cultura, tornando-se imprescindível entender a resposta da cultura de arroz na presença do FMA (Vallino et al., 2014). Além disso, com a finalidade de alimentar 9 bilhões de pessoas até 2050, também é de extrema relevância compreender o sistema radicular dessa cultura, visto que sua produtividade pode ser prejudicada nas próximas décadas, em razão da instabilidade climática e da limitação de recursos (Ahmadi et al., 2014).

2.2. Micorrizas

As micorrizas são associações mutualísticas estabelecidas entre os fungos específicos do solo e as raízes de plantas superiores. É um tipo de simbiose que abrange mais de 90% das espécies de plantas, compreendendo árvores florestais, gramíneas selvagens e várias culturas (Smith e Read, 2008; Bonfante e Genre, 2010). Esta associação surgiu há cerca de 450 milhões de anos e acredita-se que foi fundamental para a evolução das plantas terrestres, pois os fungos micorrízicos estão presentes em praticamente todo o globo terrestre como, por exemplo, zonas alpinas e boreais, florestas tropicais, pastagens e plantações (Smith e Read, 2008; Bonfante e Genre, 2010).

As micorrizas são divididas em três grupos principais: 1) micorrizas arbusculares (Figura 2) que apresentam estruturas conhecidas como arbúsculos e

em alguns casos vesículas localizadas intracelularmente, também apresentam o desenvolvimento de hifas inter e intracelular, sendo este o tipo mais comum dentre as associações micorrízicas; 2) as ectomicorrizas (Figura 2) que formam o manto através do crescimento intenso de hifas em volta da raiz, e a formação da rede de Hartig por meio do crescimento em torno das células do córtex, não havendo penetração de hifas nas células vegetais, este tipo de simbiose é mais comum em extratos florestais; e por fim, 3) as micorrizas orquidoides, exclusivas às plantas da família Orchidaceae, com desenvolvimento intracelular de hifas formando os pelotons que, semelhantemente ao arbúsculo, têm o papel de fazer a troca bidirecional de nutrientes e água por fotoassimilados (Smith e Read, 2008; Imhof, 2009).

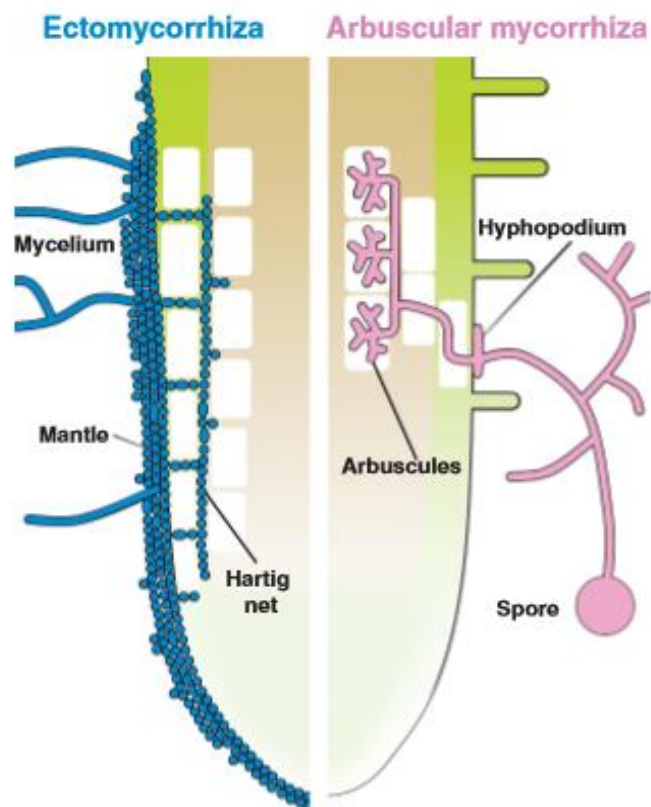


Figura 2. Estruturas de colonização das raízes nas interações ectomicorrízicas (azuis) e micorrizas arbusculares (rosa) (Bonfante e Genre, 2010).

Dentre estes tipos de simbiose, as micorrizas arbusculares são as mais difundidas (Bago et al., 2000). Os fungos desta associação são pertencentes a um grupo de fungos biotróficos do solo, incluindo mais de 250 espécies conhecidas pertencentes ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes e gêneros Gigaspora, Scutellospora, Glomus, Acaulospora e Archaeospora (Genre et al., 2005; Parniske, 2008; Brundrett e Ashwath, 2013).

Dentre os grupos de plantas, as micorrizas arbusculares ocorrem em uma ampla diversidade de plantas hospedeiras, abrangendo angiospermas, gimnospermas, pteridófitas e alguns musgos, lycopods e psilotales (Bago et al., 2000). Por isso, a maioria dos FMAs são considerados simbiontes não específicos, isto é, colonizam as raízes de diversas espécies de plantas (Smith e Read, 1997). Entretanto, alguns estudos demonstraram que os FMAs têm um certo grau de especificidade, em que certos fungos só colonizam certas plantas, porém, os mecanismos não são bem elucidados (Helgason et al., 2002; Vandenkoornhuyse et al., 2002). Chitarra., et al 2016 testaram dois FMAs *Rhizophagus intraradices* e *Funneliformis mosseae*, frente a resposta ao estresse hídrico de tomate (*Solanum lycopersicum*) e observaram que os dois FMAs possuem estratégias diferentes de colonização.

O processo de colonização por FMA (Figura 3) tem início a partir de uma troca de moléculas difusíveis (Bucher et al., 2014). As plantas produzem e secretam, através dos exudatos radiculares, estrigolactonas na rizosfera (Akiyama et al., 2005; Besserer et al., 2006), estimulando a ramificação da hifa e o metabolismo dos FMAs (Bonfant e Genre, 2010). Em contrapartida, os FMAs germinam seus esporos, gerando respostas nos tecidos radiculares (MacLean et al., 2017). Os arbúsculos são formados nas células do córtex da raiz através da diferenciação das hifas, que se tornam ramificadas (MacLean et al., 2017). É através dessa estrutura que ocorre a transferência de nutrientes do fungo para a planta, e a transferência de carboidrato da planta para o fungo (Genre et al., 2011). Os arbúsculos são envolvidos por uma membrana periarbuscular, derivada da reorganização das células corticais da planta (MacLean et al., 2017). Essas estruturas têm um tempo de duração de aproximadamente 4 a 5 dias e, no fim desse período, inicia-se o colapso das paredes dos fungos nos ramos arbusculares finos, enquanto o citoplasma se encolhe. Esse processo ocorre até que todo o arbúsculo seja reduzido a uma massa compacta de paredes celulares

da hifa, e a membrana periarbuscular se reorganiza com o objetivo de corresponder ao respectivo conteúdo mutável (Bonfant e Genre, 2010). Por fim, o fungo desaparece e a célula hospedeira readquire sua organização anterior, com um enorme vacúolo central, podendo ser novamente colonizada (Kobae e Fujiwara, 2014).

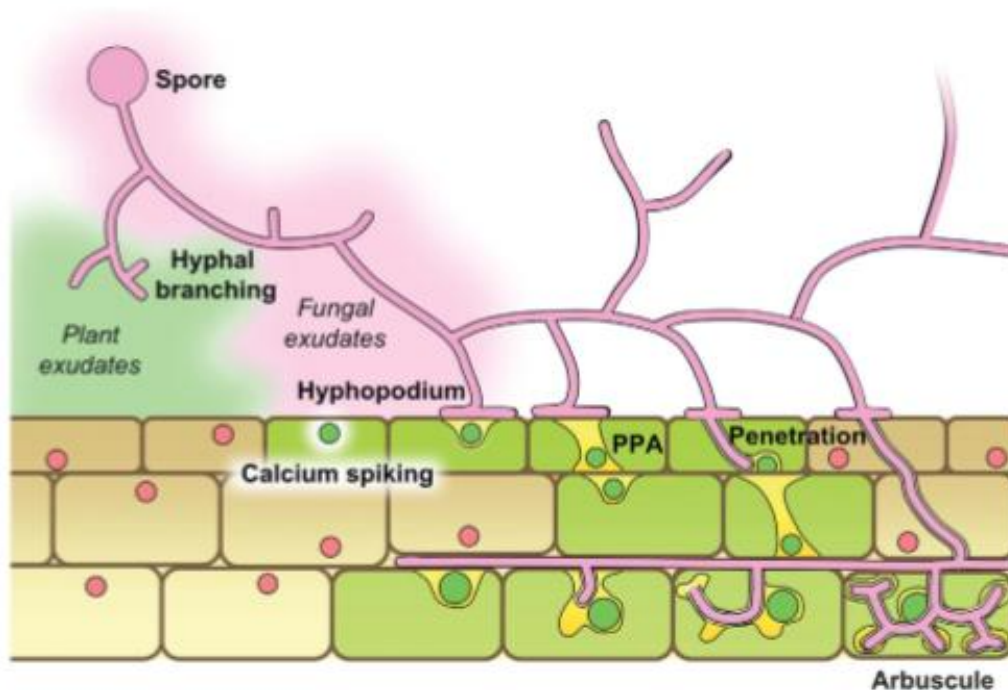


Figura 3. Processo de colonização por FMA (Bonfant e Genre, 2010).

O benefício da simbiose é que o FMA favorece o hospedeiro, promovendo sua adaptabilidade e resistência em situações de estresses bióticos e abióticos (Genre et al., 2005). As hifas do FMA exploram ambientes que antes eram inacessíveis ao sistema radicular da planta hospedeira, tornando possível a absorção de fósforo, que é o segundo elemento mineral com um papel crucial para o desenvolvimento da planta, depois do nitrogênio. Entretanto, o fósforo tem uma baixa mobilidade no solo e sua aquisição pelas raízes é complexa, principalmente porque as raízes só o assimilam na condição inorgânica, acarretando a formação de zonas de depleção de fósforo inorgânico em volta da raiz, induzindo a carência desse elemento (Balzergue et al., 2013; Fusconi et al., 2014; Nakagawa e Imaizumi-Anraku, 2015). Os solos com baixa disponibilidade

de fósforo inorgânico são favoráveis à micorrização pelos FMAs, e nessa circunstância as plantas obtêm grandes vantagens dessa simbiose (Javot et al., 2007). Por outro lado, níveis elevados de fósforo inorgânico são inibitórios a colonização por FMA (Balzergue et al., 2013).

As hifas também facilitam a absorção de nitrogênio e de diversos outros nutrientes, além da água que está na camada mais profunda do solo, sendo que essas vantagens ocorrem em ambientes naturais e agrícolas (Smith e Read, 2008; Jeong et al., 2015). A simbiose micorrízica também tem um papel crucial na resistência contra patógenos e no crescimento das plantas hospedeiras, melhorando a produtividade agrícola de forma sustentável (Zuccaro et al., 2014; Bernaola et al., 2018).

2.3. Plantas AVP1OX

A agricultura está constantemente suscetível a estresses abióticos (Pasapula et al., 2011), portanto, diversos processos biotecnológicos são utilizados para desenvolver plantas transgênicas que apresentam vantagens perante as plantas selvagens, de acordo com o ambiente em que são cultivadas (Gaxiola et al., 2001; Pasapula et al., 2011). De maneira geral, com estes avanços foi possível reduzir o uso de fertilizantes e pesticidas nas lavouras, além de elevar a produção agrícola em regiões extremas do planeta (Herrera-Estrella, 2000). Sabe-se que quando a planta está sob estresse, ocorre uma redução de seu estado energético, uma vez que a produção de ATP fica debilitada (Rea, 1993).

Desta forma, atividades celulares dependentes de ATP, como a atividade das bombas de H^+ (P- H^+ -ATPase e V- H^+ -ATPase), ficam em risco, pois estas são fundamentais para que ocorra o fluxo de solutos através das membranas plasmáticas e vacuolares (Blumwald, 2000; Hu-Cheng et al., 2003). A manutenção da concentração de solutos nos vacúolos das células vegetais é fundamental em condições adversas, como alta salinidade e seca, já que o estado hídrico e a turgescência da célula são dependentes deste fator. Nestas condições uma terceira bomba de H^+ é mais ativa, a H^+ -PPase (Colombo e Cerana, 1993; Maeshima, 1999; Park et al., 2005).

Podem ser encontradas três classes de PPases: PPase solúvel, PPase associada à membrana e H^+ -PPases. Entretanto, o transporte de prótons por

intermédio da membrana, ocorre apenas através da bomba H^+ -PPase. Essa bomba possui um único polipeptídeo com massa molecular em torno de 80 Kda e tem como substrato um pirofosfato inorgânico (PPi), que pode ser gerado como um subproduto de diversas reações, como a polimerização do DNA e RNA, sínteses de aminoacil-tRNA (síntese de proteínas), ADP-glucose (síntese de amido), UDP-glucose (síntese de celulose) e acil-CoA (β -oxidação de ácido graxo) nas células da planta (Maeshima, 1999).

As plantas apresentam dois tipos diferentes de H^+ -PPases: a do tipo I que precisa do K^+ citosólico para sua atividade e é moderadamente sensível à inibição por Ca^{2+} , e; a do tipo II que é insensível ao K^+ e muito sensível ao Ca^{2+} (Gaxiola, 2007). A síntese de RNAs, proteínas e celulose para constituição de células durante o desenvolvimento de tecido, leva a formação PPi, que é um subproduto desses processos metabólicos. A abundância de elevadas concentrações desse substrato (PPi) no citosol inibe as reações de polimerização. Sendo assim, a H^+ -PPase vacuolar recolhe o PPi no citosol e o utiliza como fonte de energia para o transporte de prótons em vacúolos em expansão (Maeshima, 1999).

Baseado nos benefícios desta proteína em situações de estresse, Gaxiola et al. (2001) realizaram transformações em plantas de *Arabidopsis* que super-expressavam o gene AVP1, responsável pela codificação da H^+ -pirofosfatase vacuolar (H^+ -PPase), obtendo como resposta aumento no acúmulo de solutos nos vacúolos das células destas plantas, verificando-se maior retenção de água e, conseqüentemente, maior tolerância a estresses abióticos. Outros benefícios desta transgenia foram observados em plantas de algodão, em que a transgenia do gene AVP1, além de torná-las mais tolerantes à seca e salinidade, também promoveu aumento na produção de fibras e melhoria na qualidade do produto final (Pasapula et al., 2011). Já Park et al. (2005), mostraram que plantas de tomate AVP1OX, foram mais resistentes à seca, devido a um aumento no volume do sistema radicular, facilitando assim, a absorção de água e a sobrevivência em ambientes de deficiência hídrica. Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de arroz AVP1OX (Zhao et al., 2006).

Desta forma é possível correlacionar os benefícios desta transgenia com os benefícios decorrentes da inoculação de plantas com FMAs. Entretanto, trabalhos neste sentido são escassos, sendo necessários mais estudos para entender os resultados desta simbiose.

2.4. As interações das plantas geneticamente modificadas com os microrganismos do solo

Os avanços na engenharia genética e a utilização prática das plantas geneticamente modificadas contribuem para maior qualidade e aumento da produção agrícola, entretanto, podem colocar em risco os microrganismos do solo (Guan et al., 2016). Isto pode ocorrer já que o DNA artificialmente introduzido nos genomas de plantas transgênicas, pode ser transferido para microrganismos simbioses (Azevedo e Araújo, 2003). Além disso, a inserção de genes estranhos nas plantas geneticamente modificadas também pode prejudicar as quantidades de exsudatos radiculares e a diversidade de espécies de microrganismos e, conseqüentemente, o desempenho do ecossistema do solo (Guan et al., 2016).

A toxina inseticida proveniente da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (toxina Bt) foi introduzida nas plantas geneticamente modificadas com o objetivo de conferir resistência contra pragas agrícolas (Cheeke et al., 2013). Um estudo em casa de vegetação demonstrou que nove linhagens diferentes de milho Bt obtiveram uma menor colonização por FMA (Cheeke et al., 2012). Por outro lado, um outro experimento, neste caso no campo, mostrou que essas linhagens podem não ser prejudiciais ao FMA (Cheeke et al., 2013). Liang et al. (2015) realizaram um estudo utilizando uma soja transgênica (ZD91) com alto teor de metionina e constataram que a transgenia não afetou a comunidade de FMA.

Nesse contexto, o progresso das tecnologias e os conhecimentos da comunidade científica são elementos fundamentais para o entendimento dos benefícios e dos riscos ecológicos e ambientais do cultivo de plantas geneticamente modificadas (Guan et al., 2016), visto que os FMAs têm uma função crucial na sustentabilidade dos ecossistemas de terras agrícolas (Liu., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar microscopicamente o processo de colonização de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) (WT) e de plantas com super-expressão da H⁺-PPase (AVP1OX), pelos FMA's *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana*, *Claroideoglossum etunicatum*, e correlacionar as alterações ultraestruturais ao nível celular com as mudanças ecofisiológicas, através da análise de parâmetros de crescimento e fotossintéticos.

3.2. Objetivos específicos

Verificar as possíveis diferenças nos parâmetros de crescimento (altura e peso seco da parte aérea; diâmetro do caule; comprimento, peso seco e volume da raiz) das plantas de arroz WT e AVP1OX, inoculadas ou não, com os fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum*.

Analisar microscopicamente e fisiologicamente a quantificação da colonização micorrízica, e evidenciar as alterações nas raízes das plantas de arroz WT e AVP1OX, inoculadas ou não, com os fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum*.

Avaliar a influência dos fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum* sob as trocas gasosas de arroz WT e AVP1OX.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das sementes, condições de crescimento e inoculação das plantas de *Oryza sativa*

As sementes de arroz (*Oryza sativa*) WT e AVP1OX, foram obtidas da Universidade do Arizona, Estados Unidos. As sementes foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 3 minutos, e posteriormente em hipoclorito 2% por 5 minutos, em seguida foram lavadas em água destilada e transferidas para sementeira contendo areia estéril.

Para a esterilização da areia foram feitas duas autoclavagens de uma hora, com intervalo de 24 horas entre uma e outra. Após o plantio, as sementes foram levadas para a câmara de crescimento (16/8 h claro/escuro; $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ao nível de superfície da folha durante o período de luz), onde foram mantidas por 15 dias. Após este período, as plantas foram então transplantadas para vasos de cultura (1 L), contendo substrato composto por uma mistura de areia e latossolo vermelho-amarelo distrófico (3:1) esterilizado, e foram inoculadas, ou não, com os fungos *Rhizophagus clarus* (RC), *Acaulospora colombiana* (AC), *Claroideoglossum etunicatum* (CE).

Em seguida as plantas foram cultivadas em casa de vegetação [interceptação de 30% da radiação ativa fotossintética, densidade máxima do fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) $\cong 1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] (Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, Latitude: 21° 45' 15" S, longitude: 41° 19' 28"

W), por 90 dias. As plantas foram regadas, duas vezes por semana, com solução de Clark ($\frac{1}{4}$ força), pH 5,5-5,6 (Clark, 1975). Todas as análises foram realizadas 90 dias após a inoculação.

4.2. Obtenção do fungo micorrízico arbuscular e parâmetros de crescimento das plantas

Os fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum* foram obtidos da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota – (CICG). Das plantas coletadas foram determinadas as seguintes características: a altura da parte aérea e o comprimento da raiz, com auxílio de uma régua graduada; o diâmetro do caule, por meio de um paquímetro manual modelo ZAAS Precision, mantendo sempre a mesma posição; o volume da raiz, com o auxílio de uma proveta, em que observou-se o deslocamento da água; e o peso seco da parte aérea e da raiz, na qual o material vegetal foi seco em estufa a 60 °C por 72 horas e, posteriormente, pesado na balança modelo BP 210 S.

4.3. Determinação da taxa de colonização micorrízica

A colonização fúngica foi realizada de acordo com o protocolo proposto de Phillips e Hayman (1970), mas com adaptações. As raízes de plantas de arroz WT e AVP1OX, inoculadas ou não com os fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum*, foram clarificadas em solução de KOH a 10% por 60 minutos, depois foram lavadas em água destilada e coradas com azul de tripano a 0,02% por 5 minutos, e novamente lavadas com água destilada.

Vinte segmentos de raiz de 1cm de comprimento foram escolhidos aleatoriamente de cada tratamento e observados em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens, e *software* AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany), para análise das imagens.

A distribuição de hifas, esporos, vesículas e arbúsculos no córtex radicular, foi tomada como um índice de colonização. A porcentagem de colonização foi determinada usando a seguinte fórmula: colonização da raiz (%) [(número de segmentos colonizados / número total de segmentos observados) × 100].

4.4. Trocas gasosas

Para as medidas de trocas gasosas foi utilizado um analisador de CO₂ no infravermelho IRGA portátil, de circuito aberto, modelo CIRAS-2 (*Portable Photosynthesis Systems, Hitchin, Hertfordshire, UK - LCA*). Quatro folhas dos dois genótipos de arroz WT e AVP1OX foram clipeadas com o auxílio de uma cuveta Parkinson, com 2,5 cm² de área foliar conectada ao CIRAS-2. Luz artificial saturante, umidade e concentração de CO₂ foram ajustadas para 2000 μmol m⁻² s⁻¹ de fótons, 80% e 375 ppm, respectivamente.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: assimilação de carbono (A: μmol m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s: μmol m⁻² s⁻¹), taxa de transpiração (E: μmol m⁻² s⁻¹), concentração interna de carbono (C_i: mol m⁻² s⁻¹), eficiência intrínseca do uso da água (iWUE: A / g_s) e razão interna/ externa de CO₂ (C_i/C_a).

4.5. Microscopia óptica - (MO)

Para a realização das análises histomorfológicas, as raízes de plantas de arroz WT e AVP1OX, inoculadas ou não com os fungos *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana* e *Claroideoglossum etunicatum*, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e tampão cacodilato 0,1 M, por 2 horas. Em seguida foram feitas três lavagens de 1 hora, com tampão cacodilato 0,1 M. Foram pós-fixadas por 1 hora, protegidas da luz, com tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,1 M. Em seguida, foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M, durante 1 hora cada etapa. Posteriormente, as raízes foram desidratadas em séries crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, e 100% super seca 2 vezes, durante 1 hora cada etapa. Para a infiltração em resina foi utilizada uma mistura de acetona/EPON®, na proporção de 3:1, 2:1,

1:1, 1:2, 1:3 e EPON puro, por 8 horas cada troca. Posteriormente as amostras foram embebidas em EPON puro, colocadas em moldes de silicone e polimerizada por 48 horas a 60 °C. Os blocos polimerizados foram seccionados em ultramicrótomo *Reichert Ultracult S*, e os cortes foram corados com solução aquosa de azul de toluidina (1,0%). As amostras foram observadas em microscópio óptico Axioplan ZEISS (Carls Zeiss, Jena, Germany), adaptado com câmera digital AxioCam MRc5 para captura de imagens, e *software* AxioVisionLE versão 4.8 (Carls Zeiss, Jena, Germany), para análise das imagens.

4.6. Análise estatística dos dados

O experimento foi realizado no delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto de dois genótipos (WT e AVP1OX) e quatro tratamentos microbiológicos (Controle não inoculado, RC, AC, CE) com 5 repetições cada. Os dados de todas as análises foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), e a diferença entre os tratamentos foram avaliadas através do teste de Tukey, a um nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas usando o programa *GraphPad Prism 7.0*.

5. RESULTADOS

5.1- Respostas no Crescimento

As plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum* apresentaram aumentos significativos de 21,91%, 21,37% e 33%, respectivamente, na altura da parte aérea em relação ao seu respectivo controle ($P=0,0015$; $P=0,0020$; $P=0,0001$, Figura 4A). Por outro lado, as plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), apresentaram um aumento significativo de 17,95% nesse parâmetro, quando foram inoculadas com o FMA *A. colombiana* comparado com seu respectivo controle ($P=0,0007$; Figura 4A).

Em relação a massa seca da parte aérea, as plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *C. etunicatum* apresentaram aumentos significativos de 46,83% e 61,33%, respectivamente, em comparação ao seu controle ($P= 0,0092$, $P= 0,0007$, respectivamente; Figura 4B). Já as plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX) apresentaram um aumento significativo de 33,95% nesse parâmetro, quando inoculadas com o FMA *A. colombiana*, em relação ao tratamento não inoculado ($P= 0,0051$; Figura 4B).

O diâmetro do colo teve um aumento significativo em plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus* de 44,89%, *A. colombiana* de 20,83% e *C. etunicatum* de 33,14%, em relação ao seu respectivo controle ($P=0,0001$, $P=0,0438$, $P=0,0002$, respectivamente; Figura 4C). As plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A.*

colombiana e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro, quando comparado com seu respectivo controle (Figura 4C).

Em relação ao comprimento da raiz, as plantas WT apresentaram um aumento significativo de 27,35% quando inoculadas com o FMA *R. clarus*, em comparação ao seu respectivo tratamento não inoculado ($P=0,0094$; Figura 5A). Já as plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX) apresentaram um aumento significativo nesse parâmetro, quando inoculada com o FMA *A. colombiana* (Figura 5A).

As plantas WT inoculadas com o FMA *C. etunicatum* apresentaram um aumento significativo de 69,11% no volume da raiz, em relação seu respectivo controle ($P=0,0029$; Figura 5B). As plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX) inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro, quando comparado com os tratamentos não inoculados (Figura 5B).

Em relação à massa seca da raiz, tanto as plantas WT quanto para aquelas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), quando inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas nesses parâmetros, quando comparados com seus respectivos controles não inoculados (Figura 5C).

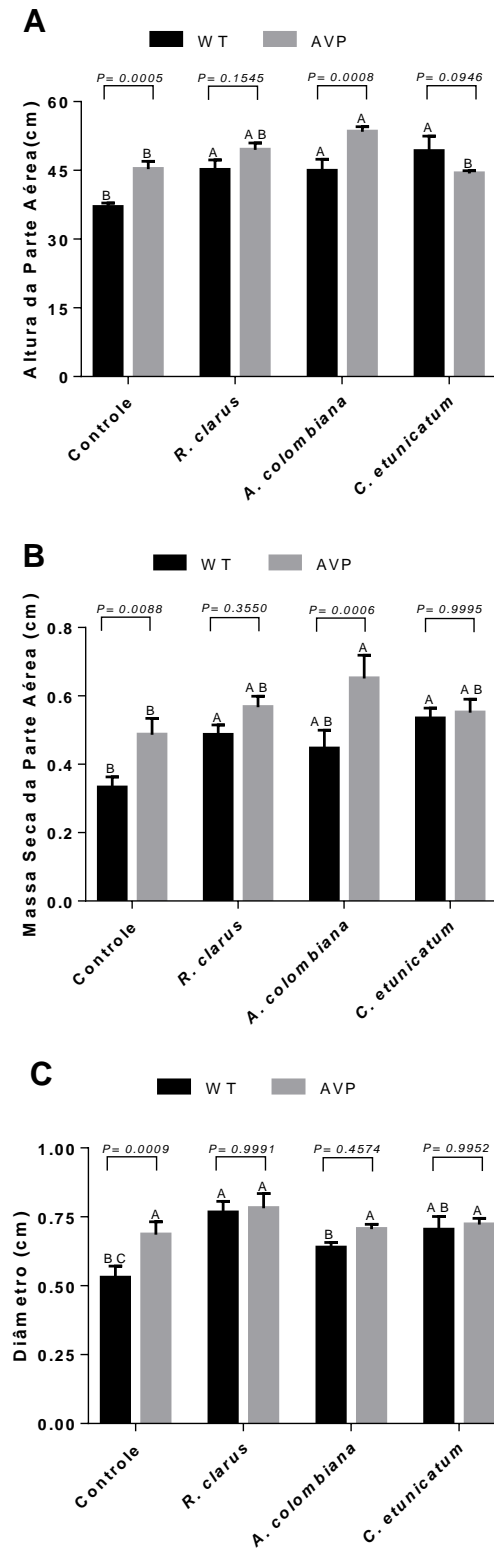


Figura 4. Altura da parte aérea (A); massa seca da parte aérea (B), diâmetro do colo (C) de folhas de arroz (WT) e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação ou não com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*. Para cada genótipo de arroz (WT ou AVP), as médias de P maior que 0.05, em diferentes condições de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4). Para cada condição de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*) médias seguidas de uma mesma letra, no mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

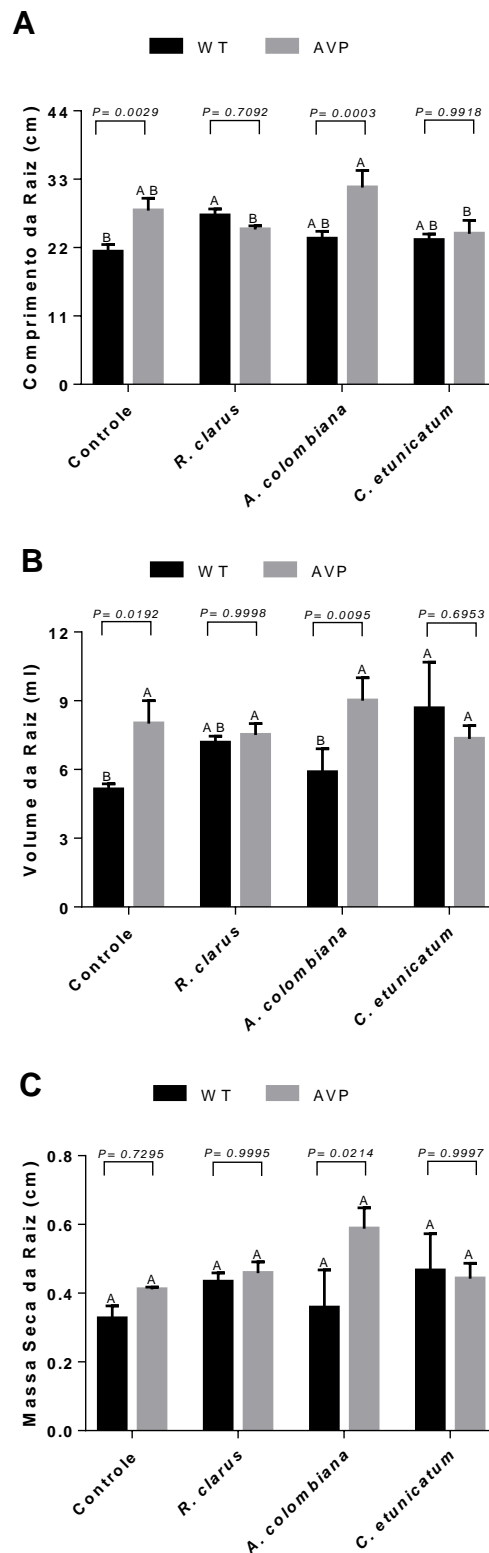


Figura 5. Comprimento da raiz (A); volume da raiz (B); massa seca da raiz (C) de folhas de arroz (WT) e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação ou não com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*. Para cada genótipo de arroz (WT ou AVP), as médias de P maior que 0.05, em diferentes condições de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4). Para cada condição de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*) médias seguidas de uma mesma letra, no mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

5.2 - Porcentagem de Colonização Micorrízica

A porcentagem de colonização das raízes de arroz WT e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos (Figura 6).

As raízes de plantas WT e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), sem inoculação dos FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram valores de colonização micorrízica consideráveis.

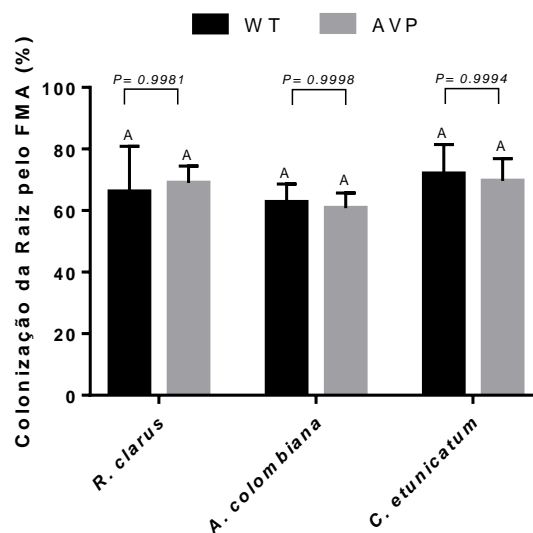


Figura 6. Porcentagem de colonização micorrízica em plantas de arroz (WT) e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*. Para cada genótipo de arroz (WT ou AVP), as médias de P maior que 0.05 em diferentes condições de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4). Para cada condição de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*) médias seguidas de uma mesma letra, no mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

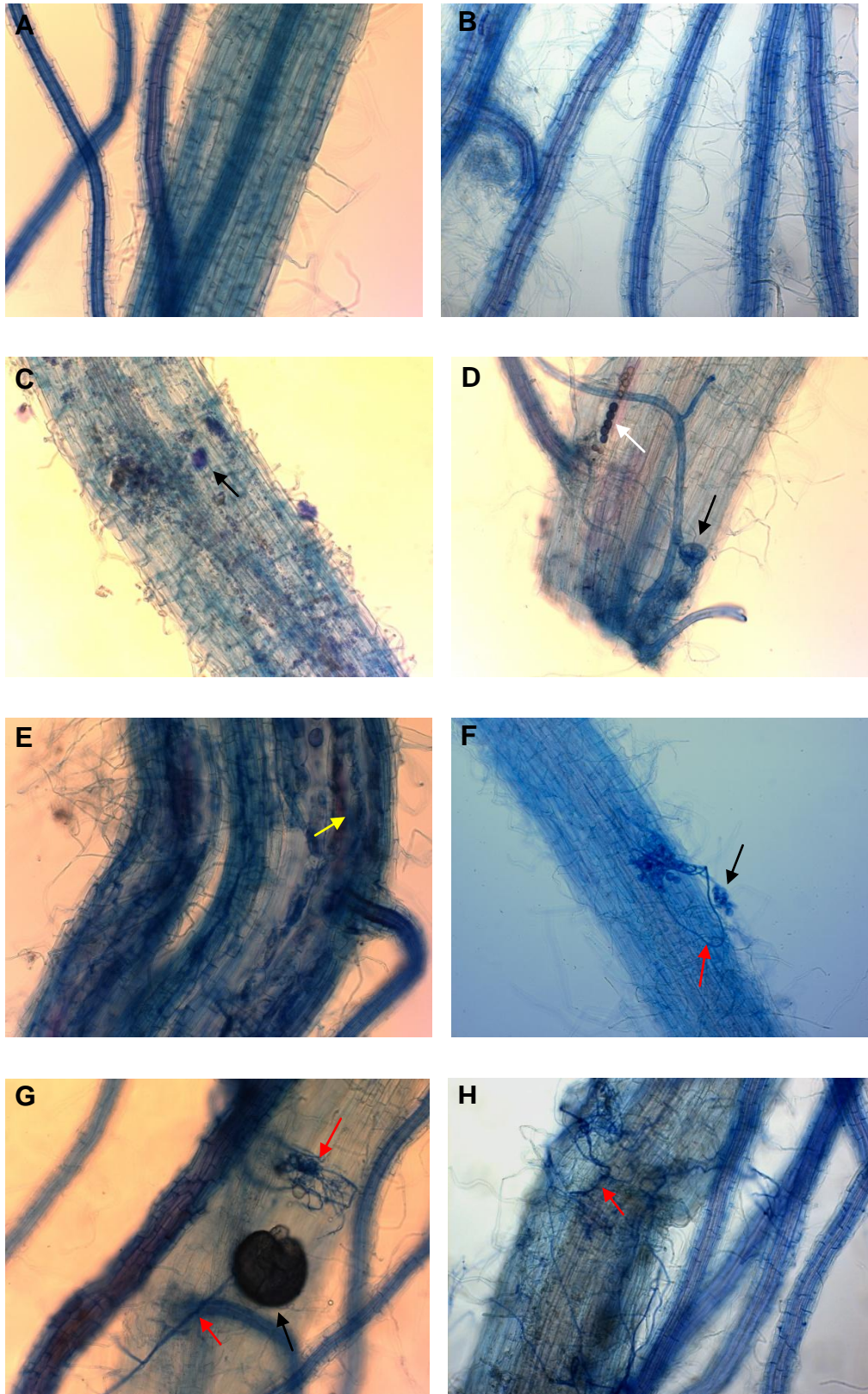


Figura 7. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de arroz WT Controle (A), AVP Controle (B), WT inoculada com *R. clarus* (C), AVP inoculada com *R. clarus* (D), WT inoculada com *A. colombiana* (E), AVP inoculada com *A. colombiana* (F), WT inoculada com *C. etunicatum* (G), AVP inoculada com *C. etunicatum* (H). As raízes colonizadas mostram a presença de hifas (seta vermelha), esporos (seta preta), vesículas (seta branca) e arbúsculos (seta amarela). As raízes foram coradas em azul de tripano a 0,02%.

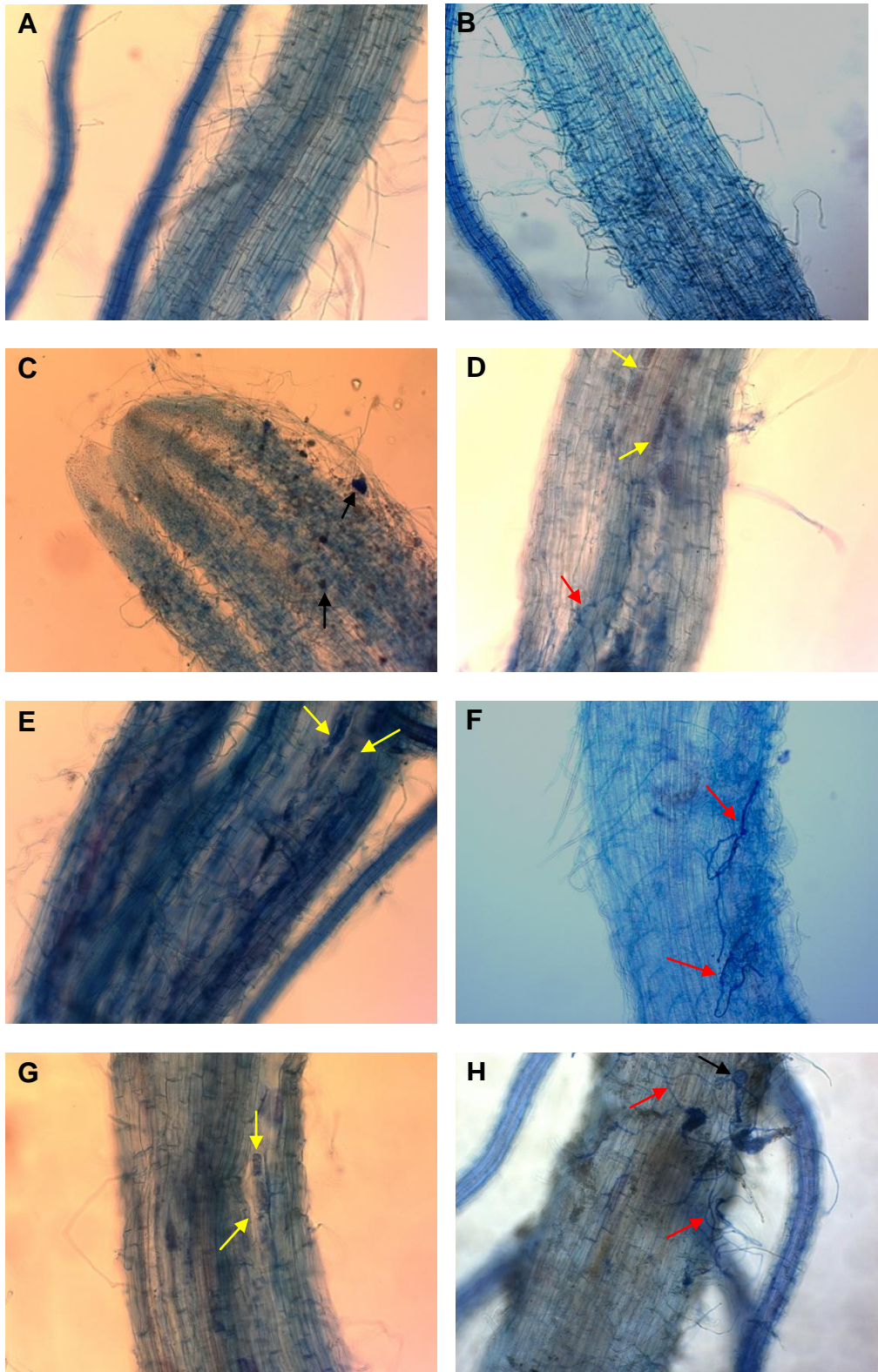


Figura 8. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de arroz WT Controle (A), AVP Controle (B), WT inoculada com *R. clarus* (C), AVP inoculada com *R. clarus* (D), WT inoculada com *A. colombiana* (E), AVP inoculada com *A. colombiana* (F), WT inoculada com *C. etunicatum* (G), AVP inoculada com *C. etunicatum* (H). As raízes colonizadas mostram a presença de hifas (seta vermelha), esporos (seta preta) e arbúsculos (seta amarela). As raízes foram coradas em azul de tripano a 0,02%.

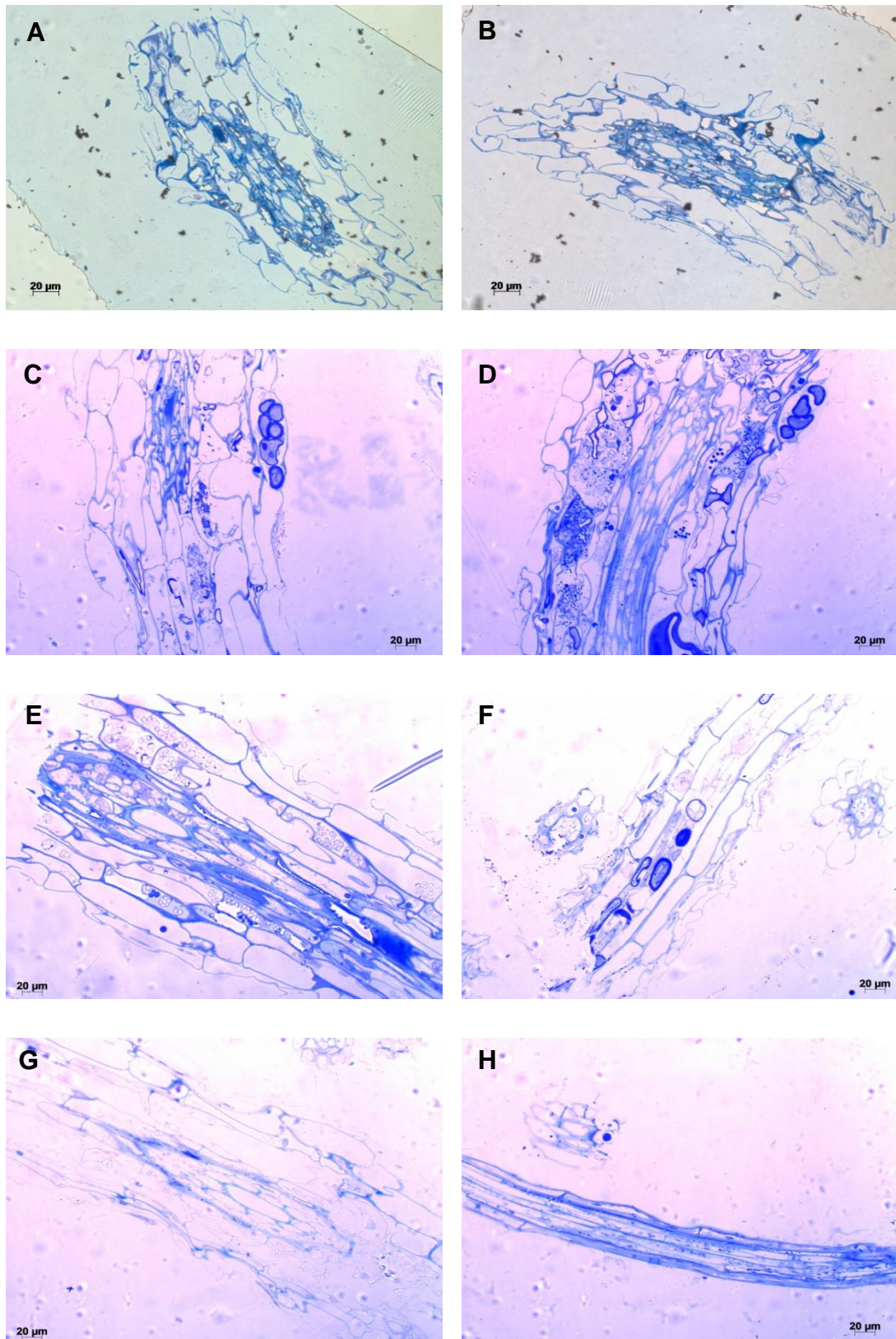


Figura 9. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de arroz WT Controle (A), AVP Controle (B), WT inoculada com *R. clarus* (C), AVP inoculada com *R. clarus* (D), WT inoculada com *A. colombiana* (E), AVP inoculada com *A. colombiana* (F), WT inoculada com *C. etunicatum* (G), AVP inoculada com *C. etunicatum* (H). As raízes foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e tampão cacodilato 0,1 M.

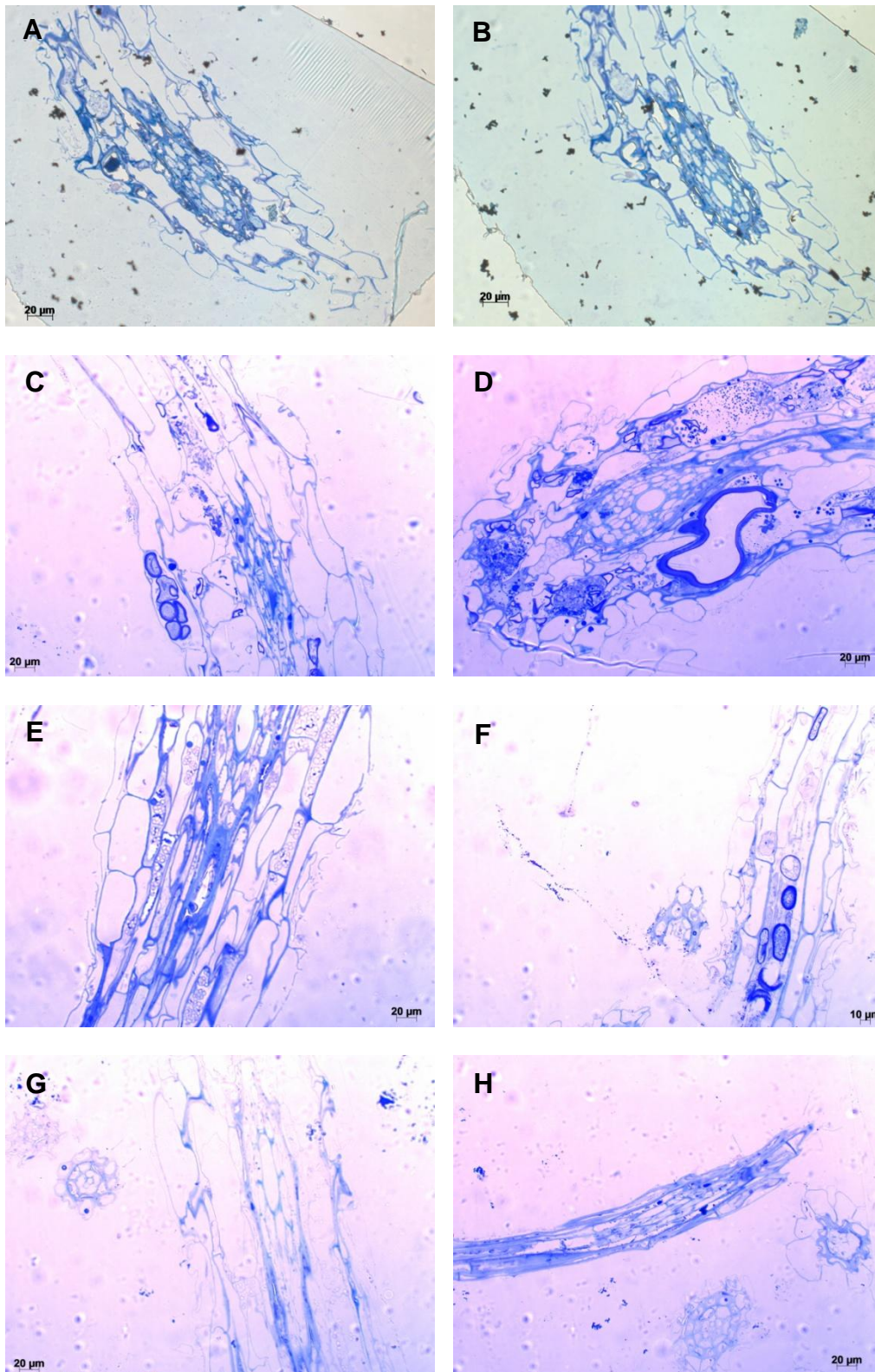


Figura 10. Micrografia representativa da colonização fúngica em raízes de arroz WT Controle (A), AVP Controle (B), WT inoculada com *R. clarus* (C), AVP inoculada com *R. clarus* (D), WT inoculada com *A. colombiana* (E), AVP inoculada com *A. colombiana* (F), WT inoculada com *C. etunicatum* (G), AVP inoculada com *C. etunicatum* (H). As raízes foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4,0% e tampão cacodilato 0,1 M.

5.3 - Assimilação de Carbono e Eficiência no Uso da Água

Na parte ecofisiológica foram analisados os parâmetros de capacidade de assimilação de carbono (A : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E : $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), concentração interna de carbono (C_i : $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), eficiência intrínseca do uso da água ($iWUE$: A / g_s) e razão interna/externa de CO_2 (C_i/C_a) (Figura 11 e 12).

No que diz respeito ao parâmetro A , as plantas WT quando inoculadas com o FMA *R. clarus* apresentaram aumento significativo de 792,46%, em relação seu respectivo controle ($P=0,0084$). Além disso, as plantas inoculadas com os FMAs *A. colombiana* e *C. etunicatum* também apresentaram significativos incrementos, quando comparados com as plantas WT não inoculadas (Figura 11A). Já as plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), inoculadas com o FMA *R. clarus*, apresentaram uma diminuição significativa de 61,65%, quando comparado ao seu respectivo controle ($P=0,0232$). No entanto, a inoculação com *A. colombiana* e *C. etunicatum* não apresentaram diferenças significativas em relação ao seu respectivo controle, no parâmetro analisado (Figura 11A).

Em relação à G_s e E , tanto as plantas WT quanto as que apresentam super-expressão da V-PPase (AVP1OX), quando inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas nesses parâmetros, quando comparados aos seus respectivos controles não inoculados (Figura 11B e C).

Em plantas WT, o parâmetro de C_i encontrado no tratamento inoculado com o FMA *R. clarus*, foi inferior ao respectivo tratamento não inoculado ($P=0,0255$; Figura 12A). Por outro lado, em plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), esse parâmetro apresentou incrementos mais significativos quando as plantas foram inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *A. colombiana*, em relação ao respectivo controle (Figura 12A).

A $iWUE$ teve um aumento significativo em plantas WT inoculadas com os FMAs, sendo: *R. clarus* de 591,61%; *A. colombiana* de 516,19%, e; *C. etunicatum* de 432,51%, em relação ao controle ($P=0,0041$, $P=0,0096$ e $P=0,0268$, respectivamente; Figura 12B). As plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX) apresentaram significativo incremento quando inoculada com *C. etunicatum*, comparado ao seu respectivo controle não inoculado (Figura 12B).

Em plantas WT, o parâmetro de C_i/C_a nos tratamentos inoculados com o FMA *R. clarus*, foram inferiores em comparação ao respectivo tratamento não inoculado ($P=0,0298$; Figura 12C). Por outro lado, em plantas com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *A. colombiana*, apresentaram significativos incrementos nesse parâmetro, quando comparados com seu respectivo controle (Figura 12C).

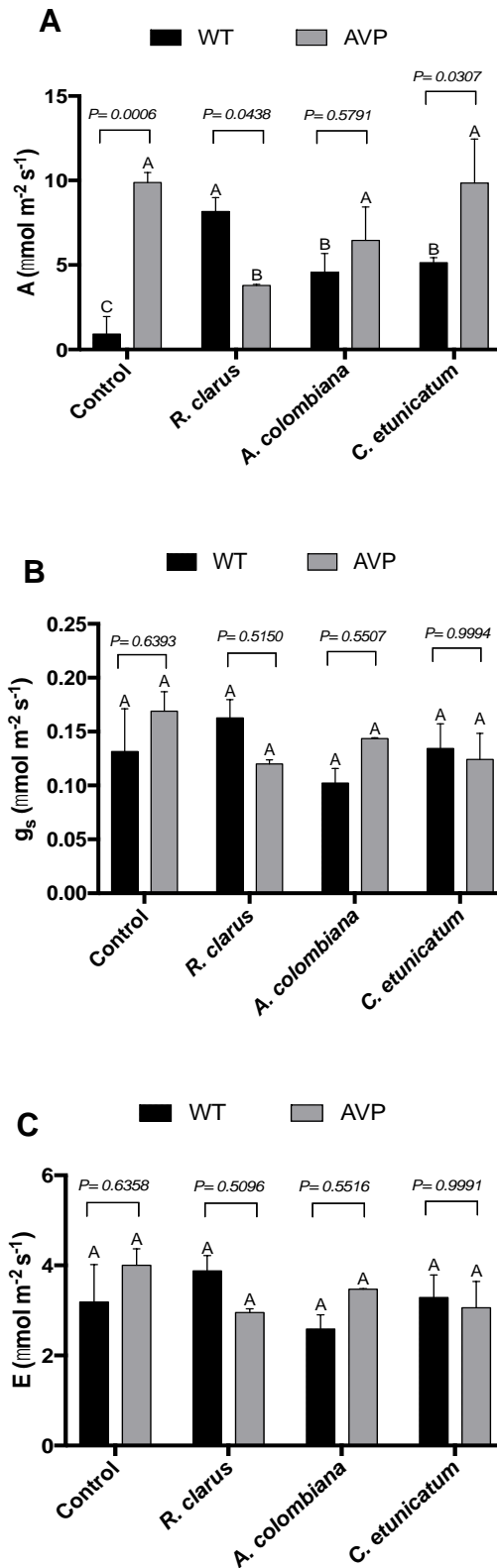


Figura 11. Assimilação de carbono (A) (A); condutância estomática (g_s) (B); transpiração (E) (C) de folhas de arroz (WT) e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação ou não com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*. Para cada genótipo de arroz (WT ou AVP), as médias de P maior que 0.05 em diferentes condições de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($n=4$). Para cada condição de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*) médias seguidas de uma mesma letra, no mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($n=4$).

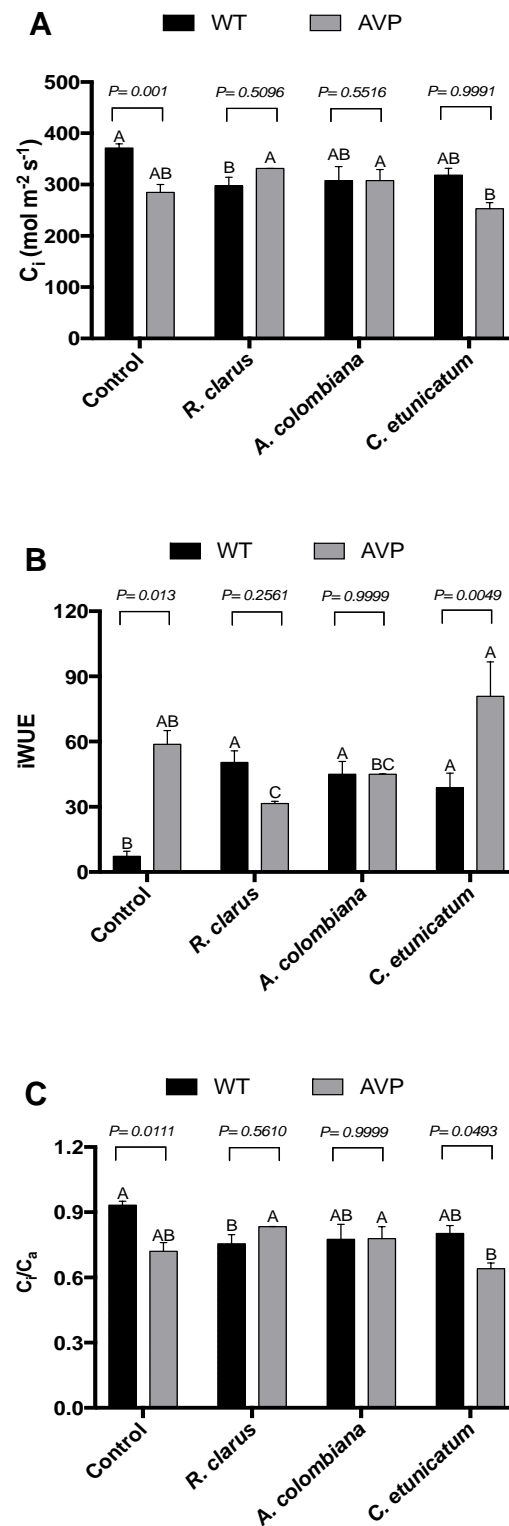


Figura 12. Concentração interna de carbono (C_i) (A); eficiência no uso d'água (iWUE) (B); razão interna/ externa de CO_2 (C_i/C_a) (C) de folhas de arroz (WT) e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX), aos 90 dias após a inoculação com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*. Para cada genótipo de arroz (WT ou AVP), as médias de P maior que 0.05 em diferentes condições de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*), não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4). Para cada condição de inoculação (Controle, *R. clarus*, *A. colombiana*, *C. etunicatum*) médias seguidas de uma mesma letra, no mesmo genótipo, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

6. DISCUSSÃO

A associação entre os FMAs e as raízes das plantas é considerada primordial para evolução das plantas terrestres (Smith e Read, 2008; Bonfante e Genre, 2010). Os FMAs promovem benefícios como: aumento do crescimento, da assimilação de nutrientes, da fotossíntese, e a adaptabilidade e resistência em situações de estresses bióticos e abióticos nas plantas hospedeiras, aprimorando a produtividade agrícola de forma sustentável (Genre et al., 2005; Smith e Read, 2008; Zuccaro et al., 2014; Liu et al., 2014; Cavagnaro et al., 2015; Jeong et al., 2015; Liu et al., 2016; Bernaola et al., 2018).

Nesse mesmo contexto, as plantas transgênicas super-expressando a V-PPase foram reconhecidas como relevantes para a produção agrícola, por propiciarem o crescimento e a produção de plantas, como arroz, algodão e tomate, facilitando sua absorção de água e sobrevivência em solos com baixo potencial hídrico (Park et al., 2005; Zhao et al., 2006; Pasapula et al., 2011).

No entanto, a utilização de FMAs com as plantas transgênicas, ainda permanece como um grande desafio, pois alguns cientistas apontam que essas plantas, geneticamente modificadas, podem prejudicar a assembleia de microrganismos e conseqüentemente sua colonização, entretanto outros pesquisadores expõem que essas plantas não influenciam na assembleia de microrganismos, existindo uma controvérsia em relação ao assunto (Azevedo e Araujo, 2003; Meyer et al., 2013; Cheeke et al., 2013; Liang et al., 2015; Guan et al., 2016).

No presente estudo, foi analisado o processo de colonização de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) WT e AVP10X pelos FMAs *Rhizophagus clarus*, *Acaulospora colombiana*, *Claroideoglossum etunicatum* e os seus respectivos efeitos sobre as respostas morfológicas e ecofisiológicas das plantas.

Observou-se neste estudo que as plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, e as plantas AVP inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *A. colombiana*, apresentaram incrementos significativos em termos de altura da parte aérea, em comparação aos tratamentos não inoculados. Também foi demonstrado que tanto as plantas WT, quanto as plantas AVP, inoculadas com esses três FMAs, obtiveram incrementos significativos na massa seca da parte aérea, em comparação aos respectivos controles. Em estudo realizado por Bertolazi et al. (2019), utilizou-se esses mesmos genótipos e também foram observadas respostas significativas em relação a esses dois parâmetros quando as plantas foram inoculadas com o fungo endofítico *P. indica*, em comparação aos tratamentos não inoculados.

Porcel et al. (2015) verificaram que plantas de arroz inoculadas com o FMA *Glomus etunicatum*, também apresentaram aumentos significativos na massa seca da parte aérea em relação ao tratamento não inoculado, quando foram expostas ao estresse salino. O mesmo resultado ocorreu nas plantas não estressadas, semelhante ao constatado nesse trabalho. Observou-se a partir destes resultados que o acúmulo de biomassa está relacionado ao desempenho fotossintético das plantas (Chen et al., 2017).

De acordo com Oliveira et al. (2019), plantas de *Piper aduncum* inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *C. etunicatum* apresentaram um incremento significativo na altura e no comprimento da raiz, aos 30 e 90 dias após a inoculação, quando comparadas com as plantas controle. Estes dados corroboram os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que as plantas WT inoculadas com esses mesmos FMAs apresentaram um aumento significativo na altura da parte aérea e no comprimento da raiz, em relação ao tratamento não inoculado.

Chen et al. (2017) realizaram um estudo utilizando três composições fúngicas micorrizas arbusculares, foram elas: VT (*Claroideoglossum* sp., *Funneliformis* sp., *Diversispora* sp., *Glomus* sp., e *Rhizophagus* sp.), BF (intraradiciais *Glomus*, *G. microagregatum* BEG e *G. Claroideum* BEG 210) e Fm

(*Funneliformis mosseae*), todas inoculadas em mudas de pepinos. Os autores observaram um aumento significativo na altura da planta e no diâmetro do caule, aos 53 dias após a inoculação com VT em 55,79% e 33,80%; seguidos por BF em 26,02% e 14,81%; e por Fm em 22,46% e 11,81%, respectivamente, quando comparados ao controle. No presente estudo também foi observado um aumento na altura da parte aérea no genótipo WT inoculado com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, e no genótipo AVP inoculados com os FMAs *R. clarus* e *A. colombiana*. No diâmetro do colo houve um incremento significativo nas plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *C. etunicatum*.

Segundo Zhang et al. (2016), as plantas *Robinia pseudoacacia* L. (gafanhoto preto) inoculadas com os FMAs *Rhizophagus irregularis* e *Glomus versiforme* apresentaram um aumento significativo no comprimento e no volume da raiz, quando comparadas ao tratamento não inoculado. No presente trabalho, observou-se que as plantas WT inoculadas com os três FMAs e as plantas AVP inoculadas com o FMA *A. colombiana*, obtiveram aumentos significativos no comprimento da raiz, em comparação aos respectivos controles. O genótipo WT também teve aumentos significativos no volume da raiz quando inoculado com os FMAs *R. clarus* e *C. etunicatum*, em relação ao respectivo controle.

A partir dos dados obtidos neste estudo observou-se que as plantas WT inoculadas com os três FMAs apresentaram aumentos significativos na altura da parte aérea e no comprimento da raiz, em comparação com o tratamento não inoculado. Allah et al. (2015) mostraram que plantas de *Sesbania Sesban* inoculadas com FMAs, apresentaram incrementos significativos nesses mesmos parâmetros, em relação ao tratamento não inoculado, porém, o estudo dos autores foi conduzido em condições de estresse salino.

O aumento na assimilação de nutrientes induzido pelos FMAs estimula várias enzimas e metabólitos, como as giberlina e auxinas, que são hormônios presentes na regulação do crescimento das plantas, tanto em condições normais, quanto em condições de estresse (Yuan et al., 2010; Allah et al., 2015).

No presente trabalho observou-se que as raízes de arroz WT e AVP inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, não apresentaram diferenças significativas entre os genótipos. Souza (2016) também demonstrou que esses mesmos genótipos não apresentaram diferenças significativas entre eles, quando foram inoculados com o FMA *S. heterogama*.

Liang et al. (2015) realizaram um estudo utilizando uma soja transgênica (ZD91) com alto teor de metionina, e constataram que a transgenia não afetou a comunidade de FMA. Estes resultados corroboram os dados do presente trabalho, onde também se verificou que a transgenia não influenciou na colonização dos três FMAs.

Bernaola et al. (2018) realizaram um estudo no Sul dos Estados Unidos, incluindo Texas, Mississippi, Arkansas e duas estações de pesquisa na Louisiana, durante três anos, e observaram que as raízes de arroz foram colonizadas de forma natural pelos FMAs presentes nesses locais de estudo, e apresentaram hifas, arbúsculos e vesículas, que são estruturas típicas dessa simbiose. Essas estruturas micorrízicas nas raízes de arroz WT e AVP, também foram observadas no presente trabalho, após a inoculação com os três FMAs.

Oliveira et al. (2019) demonstraram, através de análise microscópica, que plantas de *Piper aduncum* inoculadas com os FMAs *R. clarus* e *C. etunicatum* apresentaram hifas, arbúsculos e vesículas, o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho, onde também foram observadas essas mesmas estruturas micorrízicas, quando as plantas WT e AVP foram inoculadas com esses mesmos FMAs. A presença dessas estruturas micorrízicas nas raízes das plantas indicam colonização, e é através dos arbúsculos que ocorrem a transferência de nutrientes do fungo para a planta e a transferência de carboidratos da planta para o fungo (Genre et al., 2011). As vesículas são globulares ou elípticas e servem como estruturas de reserva para o fungo, pois armazenam lipídios e glicogênio (Smith e Read, 2008).

Bertolazi et al. (2019) analisaram o parâmetro de assimilação de carbono de plantas WT e AVP inoculadas com o fungo endofítico *P. indica*, e mostraram que esses dois genótipos foram significativos em relação aos respectivos tratamentos não inoculados. O mesmo foi observado neste trabalho, onde as plantas WT inoculadas com os FMAs *R. clarus*, *A. colombiana* e *C. etunicatum*, e as plantas AVP inoculadas com os FMAs *A. colombiana* e *C. etunicatum*, obtiveram incrementos significativos na assimilação de carbono, quando comparados com os seus respectivos controles. Esse parâmetro também foi analisado por Souza (2016), que verificou aumentos significativos nas plantas WT e AVP inoculadas com o FMA *Scutellospora heterogama*.

Porcel et al. (2015) observaram que plantas de arroz inoculadas com o FMA *Glomus etunicatum*, em condições de estresse salino (NaCl 150 mM) e até mesmo em condições normais, apresentaram aumentos significativos nos parâmetros de assimilação de carbono, condutância estomática e taxa de transpiração, corroborando os resultados demonstrados no presente estudo.

Nesse trabalho constatou-se que a eficiência intrínseca do uso da água foi significativamente superior nas plantas WT inoculadas com os três FMAs, e nas plantas AVP quando inoculadas com o FMA *C. etunicatum*, em relação às plantas dos dois genótipos não inoculadas. Em outro trabalho foi observado um aumento nesse parâmetro tanto nas plantas WT como nas plantas AVP, inoculadas com o fungo endofítico *P. indica* (Bertolazi et al., 2019).

Pressupõe-se que este aumento nas trocas gasosas das plantas inoculadas com os FMAs, ocorrem devido ao aumento na assimilação de nutrientes, alterações nos níveis hormonais das plantas hospedeiras e maior eficiência na aquisição de água (Ebel et al., 1997; Goicoechea et al., 1997; Sheng et al., 2008; Ruiz-Lozano e Aroca, 2010), promovendo o aumento fotossintético destas plantas (Birhane et al., 2012).

7. RESUMO E CONCLUSÕES

Os dados obtidos a partir do presente trabalho demonstram que as interações simbióticas podem promover o crescimento e o desempenho fotossintético das plantas WT e, principalmente, das plantas AVP1OX, que foram mais eficientes quando comparadas com as plantas WT. Entretanto, as plantas AVP1OX quando inoculadas com o FMA *R. clarus* tiveram inibições nos parâmetros fotossintéticos, demonstrando que espécies diferentes de FMAs promovem respostas distintas em plantas de arroz, existindo graus de especificidade para cada fungo. Estes resultados demonstram que são necessários estudos complementares, para entender melhor os mecanismos e as vias regulatórias subjacentes à colonização das plantas AVP1, e seus respectivos efeitos nos parâmetros ecofisiológicos. O mesmo ocorre em relação à importância de estudos complementares também sobre o sinergismo entre os FMAs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadi, N., Audebert, A., Bennett, M, J., Bishopp, A., Oliveira, A, C., Courtois, B., Diedhiou, A., Diévar, A., Gantet, P., Ghesquière, A., Guiderdoni, E., Henry, A., Inukai, Y., Kochian, L., Laplaze, L., Lucas, M., Luu, D, T., Manneh, B., Mo, X., Muthurajan, R., Périn, C., Price, A., Robin, S., Sentenac, H., Sine, B., Uga, Y., Véry, A, A., Wissuwa, M., Wu, P., Xu, J. (2014). The roots of future rice harvests. *Rice a SpringerOpen Journal*. 7 (29): 1-9.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K., Hayashi H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. 435: 824-827.
- Allah, E, F, A., Hashem, A., Alqarawi, A, A., Bahkali, A, H., Alwhibi, M, S. (2015). Enhancing growth performance and systemic acquired resistance of medicinal plant *Sesbania sesban* (L.) Merr using arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 274-283.
- Amarante, C, V, T., Zanardi, O, Z., Miqueloto, A., Steffens, C, A., Erhart, J., Almeida, J, A. (2009) Quantificação da área e do teor de clorofilas em folhas de plantas jovens de videira, Cabernet sauvignon mediante métodos não destrutivos. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal, 31(3): 680-686.
- Azevedo, J, L., Araujo, W, L. (2003) Genetically modified crops: environmental and human health concerns. *Mutation Research*, 544: 223–233.
- Bago, B., Pfeffer, P, E., Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiol*, 124: 949-957.
- Balzerque, C., Chabaud, M., Barke, D, G., Bécard, G., Rochange, S, F. (2013) High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Frontiers Plant Science*, 4: 1- 15.
- Bernaola, L., Cange, g., Way, M, O., Gore, J., Hardke, J., Stout, M. (2018). Natural Colonization of Rice by Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Different Production Areas. *Science*. 25(3): 169- 174.

- Bernaola, L., Cosme, M., Schneider, R. W., Stout, M. (2018). Belowground Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increases Local and Systemic Susceptibility of Rice Plants to Different Pest Organisms. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1-16.
- Bertolazi, A. A., Souza, S. B., Ruas, K. F., Campostrini, E., Rezende, C. E., Cruz, C., Melo, J., Colodete, C. M., Varma, A., Ramos, A. C. (2019). Inoculation With *Piriformospora indica* Is More Efficient in Wild-Type Rice Than in Transgenic Rice Over-Expressing the Vacuolar H^C-PPase. *Frontiers in Microbiology*, 10(10): 1-16.
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J-C., Roux, C., Bécard, G., Séjalon-Delmas, N. (2006). *PLoS Biol* 4(7): e226, 1239-1247.
- Birhane, E., Sterck, F. J., Fetene, M., Bongers, F., Kuyper, T. W. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia*, 169(4): 895-904.
- Blumwald, E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 12:431–434.
- Bonfante, P., Genre A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1:48, 1-11.
- Bravo, A., Brands, M., Wewer, V., Dormann, P., Harrison, M. J. (2017). Arbuscular mycorrhiza-specific enzymes FatM and RAM2 fine-tune lipid biosynthesis to promote development of arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 214: 1631–1645.
- Brundrett, M. C., Ashwath, N. (2013) Glomeromycotan mycorrhizal fungi from tropical Australia III. Measuring diversity in natural and disturbed habitats. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 370:419-433.
- Bucher, M., Hause, B., Krajinski, F., Kuster, H. (2014). Through the doors of perception to function in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 204: 833–840.
- Cavagnaro, T. R., Bender, S. F., Asghari, H. R., Heijden, M. G. A. V. (2015). The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends Plant Sci*, 20: 283–290.
- Cheeke, T. E., Cruzan, M. B., Rosenstiel, T. N. (2013). Field Evaluation of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization in *Bacillus thuringiensis* Toxin-Expressing (Bt) and Non-Bt Maize. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (13): 4078–4086.
- Cheeke, T. E., Rosenstiel, T. N., Cruzan, M. B. (2012). Evidence of reduced arbuscular mycorrhizal fungal colonization in multiple lines of Bt maize. *American Journal of Botany*, 99 (4): 700–707.
- Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M., Ahammed, G. J. (2017). Combined Inoculation with Multiple

- Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Growth, Nutrient Uptake and Photosynthesis in Cucumber Seedlings. *Frontiers in Microbiology*, 2516(8): 1-11.
- Chitarra, W., Pagliarani, C., Maserti, B., Lumini, E., Siciliano, I., Cascone, P., Schubert, A., Gambino, G., Balestrini, R., Guerrieri, E. (2016). Insights on the Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Tomato Tolerance to Water Stress¹[OPEN]. *Plant Physiology*, 171: 1009–1023.
- Coudert, Y., Périn, C., Courtois, B., Khong, N. G., Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice, the model cereal. *Trends in Plant Science*, 15 (4): 219–226.
- Dunfield, K. E., Germida, J. J. (2004). Impact of Genetically Modified Crops on Soil- and Plant-Associated Microbial Communities. *Journal of Environmental Quality*, 33: 806–815.
- Duvick D, N. (2005) The contribution of breeding to yield advances in maize. *Academic Press*, San Diego, CA. 86: 83-145.
- Ebel, R. C., Duan, X., Still, D. W., Augé, R. M. (1997). Xylem sap abscisic acid concentration and stomatal conductance of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in drying soil. *New phytologist*, 135(4): 755-761.
- Fusconi, A. (2014). Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation? *Annals of Botany*, 113: 19–33.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., Fink, G. R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H1-pump. *PNAS*, 98 (20): 11444-11449.
- Gaxiola, R. A., Palmgren M, G., Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters*, 581: 2204-2214.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., Barker, D. G. (2005) Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell*, 17: 3489–3499.
- Genre, A., Ivanov, S., Fendrych, M., Faccio, A., Zársky, V., Bisseling, T., Bonfante, P. (2011). Multiple Exocytotic Markers Accumulate at the Sites of Perifungal Membrane Biogenesis in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Cell Physiol*, 53 (1): 244–255.
- Goicoechea, N., Antolin, M. C., Sánchez-Díaz, M. (1997). Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiologia Plantarum*, 100(4): 989-997.
- Grist D.H. (1986) *Rice*. Longman, New York, USA.
- Guan, Z-J, Lu, S-B, Huo, Y-L, Guan, Z-P, Liu, B, Wei, W. (2016). Do genetically modified plants affect adversely on soil microbial communities? *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 235: 289–305.

- Gutjahr, C., Casieri, L., Paszkowski U. (2009). Glomus intraradices induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling. *New Phytologist*, 182: 829–837.
- Helgason, T., Merryweather, J. W., Denison, J., Wilson, P., Young, J. P. W., Fitter, A. H. (2002). Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, 90: 371–384.
- Herrera-Estrella, L. R. (2000). Genetically Modified Crops and Developing Countries. *Plant Physiology*. 124, 923–925.
- Imhof S (2009) Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas-three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification. *Mycorrhiza*, 19: 357-363.
- Javot, H., Pumplin, N., Harrison, M. J. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant, Cell and Environment*, 30: 310–322.
- Jeong, K., Mattes, N., Catausan, S., Chin, J. H., Paszkowski, U., Heuer, S. (2015). Genetic diversity for mycorrhizal symbiosis and phosphate transporters in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57 (11): 969-979.
- Kobae, Y., Fujiwara, T. (2014) Earliest Colonization Events of Rhizophagus irregularis in Rice Roots Occur Preferentially in Previously Uncolonized Cells. *Plant Cell Physiol*, 55(8): 1497–1510.
- Kobae, Y., Hata, S. (2010) Dynamics of Periarbuscular Membranes Visualized with a Fluorescent Phosphate Transporter in Arbuscular Mycorrhizal Roots of Rice. *Plant Cell Physiol*, 51(3): 341–353.
- Kubo, M., Purevdorj, M. (2004). The Future of Rice Production and Consumption. *Journal of Food Distribution Research*, 35(1): 128- 142.
- Kuhlgert, S., Austic, G., Zegarac, R., Osei-Bonsu, I., Hoh, D., Chilvers, M. I., ... & Kramer, D. M. (2016). MultispeQ Beta: a tool for large-scale plant phenotyping connected to the open PhotosynQ network. *Royal Society open science*, 3(10): 160592.
- Liang, J., Meng, F., Sun, S., Wu, C., Wu, H., Zhang, M., Zhang, H., Zheng, X., Song, X., Zhang, Z. (2015). Community Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Rhizospheric Soil of a Transgenic High-Methionine Soybean and a Near Isogenic Variety. *PLoS ONE*, 10 (12): 1-14.
- Liu, A. R., Chen, S. C., Chang, R., Liu, D. L., Chen, H. R., Ahammed, G. J. (2014). Arbuscular mycorrhizae improve low temperature tolerance in cucumber via alterations in H₂O₂ accumulation and ATPase activity. *J. Plant Res.*, 127: 775–785.
- Liu, A. R., Chen, S. C., Wang, M. M., Liu, D. L., Chang, R., Wang, Z. H., et al. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungus alleviates chilling stress by boosting redox poise and antioxidant potential of tomato seedlings. *J. Plant Growth Regul.*, 35: 109–120.

- Liu, W. (2010). Do genetically modified plants impact arbuscular mycorrhizal fungi? *Ecotoxicology*, 19: 229–238.
- MacLean, A. M., Bravo, A., Harrison, M. J. (2017). Plant Signaling and Metabolic Pathways Enabling Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *The Plant Cell*, 29: 2319–2335.
- Maeshima, M. (1999). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 37-51.
- Meyer, J. B., Song-Wilson, Y., Foetzki, A., Luginbuhl, C., Winzeler, M., Kneubuhler, Y., Matasci, C., Mascher-Frutschi, F., Kalinina, O., Boller, T., Keel, C., Maurhofer M. (2013). Does Wheat Genetically Modified for Disease Resistance Affect Root-Colonizing Pseudomonads and Arbuscular Mycorrhizal Fungi? *PLOS ONE*, 8 (1): 1-12.
- Montaño, F. P., Villegas, C. A., Bellogín, R. A., Cerro, P.D., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Ollero, T., Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169: 325-336.
- Nagata, T., Hosaka-Sasaki, A., Kikuchi, S. (2016). The Evolutionary Diversification of Genes that Encode Transcription Factor Proteins in Plants. *Elsevier Inc.*, 73-97.
- Nakagawa, T., Imaizumi-Anraku, H. (2015). Rice arbuscular mycorrhiza as a tool to study the molecular mechanisms of fungal symbiosis and a potential target to increase productivity. *Rice a SpringerOpen Journal*, 8 (32): 1-9.
- Naus, J., Prokopova, J., Rebíček, J., Spundova, M. (2010) SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynth Res.*, 105: 265–271.
- Oliveira, J. S. F., Xavier, L. P., Lins, A., Andrade, E. H. A., Maia, J. G. S., Mello, A. H., Setzer, W. N., Ramos, A. R., Silva, J. K. R. (2019). Effects of inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi on the composition of the essential oil, plant growth, and lipoxygenase activity of *Piper aduncum* L. *AMB Express*, 29 (9): 1-12.
- Park, S., Li, J., Pittman, J. K., Berkowitz, G. A., Yang, H., Undurraga, S., Morris, J., Hirschi, K. D., Gaxiola, R. A. (2005). Up-regulation of a H-pyrophosphatase (H-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (52): 18830-18835.
- Parniske, M. (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6:763-775.
- Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., Zhu, L., Zhang, X., Auld, D., Blumwald, E., Zhang, H., Gaxiola, R., Payton, P. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance

- and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 88–99.
- Phillips, J. M., and Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55:158–161.
- Porcel, R., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Aroca, R., Garcia, R., RuizLozano, J. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. *Journal of plant physiology*, 185: 75-83.
- Rea, P, A. (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44: 157-80.
- Ruiz-Lozano, J, M., Aroca, R. (2010). Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. *In: Koltai, Hinanit, Kapulnik, Yoram (Eds.) Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, 239-256.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18 (6-7): 287-296.
- Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. London, Academic Press.
- Souza, S. B. (2016). *Crescimento, nutrição, fisiologia e bioenergética de plântulas de arroz (Oryza sativa L.) e transgênico (AVP10X) inoculados com micro-organismos promotores do crescimento vegetal*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF,1-72.
- Strasser, R. J., Srivasta, A., Tsimilli-Michel, M. (2000). The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In: Yunus, M, Pathe, U., Mohanty, P. (eds), Probing Photosynthesis: mechanism, regulation and adaptation*. London, Taylor and Francis, 445 – 483.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2004). Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. *In: Papageorgiou, G., Govindjee (Eds.), Advances in Photosynthesis and Respiration*. vol. 19: Chlorophyll fluorescence: a Signature of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 321–362.
- Sweeney, M., McCouch, S. (2007). The Complex History of the Domestication of Rice. *Annals of Botany*. 100, 951–957.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J, G., Yamanishi, O, K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya L.* *Brazilian Journal Plant Physiology*, 14: 203-210.

- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G. de, Bressan-Smith, R.E. (2005) Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in Coffea leaves. *Scientia Horticulturae*, 104: 199- 209.
- Vallino, M., Fiorilli, V., Bonfante, P. (2014). Rice flooding negatively impacts root branching and arbuscular mycorrhizal colonization, but not fungal viability. *Plant, Cell and Environ*, 37: 557–572.
- Vandenkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T, J., Watson, I, J., Duck, J, M., Fitter, A, H., Young, J, P, W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11: 1555–1564.
- Wang, Y., Li, T., Li, Y., Björn, L, O., Rosendahl, S., Olsson, P, A., Li, S., Fu X. (2015). Community Dynamics of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in High-Input and Intensively Irrigated Rice Cultivation Systems. *Aem.asm.org.*, 81 (8): 2958- 2965.
- Yuan, Z, L., Zhang, C, L., Lin, F, C. (2010). Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: progress and approaches. *J. Plant Growth Regul.*, 29: 116-126.
- Zhang, H., Liu, Z., Chen, H., Tang, M. (2016). Symbiosis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Robinia pseudoacacia* L. Improves Root Tensile Strength and Soil Aggregate Stability. *PLOS ONE*, 11 (4): 1-12.
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Langen G. (2014). Broad compatibility in fungal root symbioses. *Current Opinion in Plant Biology*. 20:135–145.