

MURIEL DA SILVA FOLLI PEREIRA

**FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR E GLICINA BETAÍNA
AUMENTAM A TOLERÂNCIA DE PINHÃO-MANSO EM CONDIÇÕES DE
ESTRESSE ABIÓTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P436f
2012

Pereira, Muriel da Silva Folli, 1984-

Fungo micorrízico arbuscular e glicina betaína aumentam a tolerância de pinhão-mansão em condições de estresse abiótico / Muriel da Silva Folli Pereira. – Viçosa, MG, 2012.
x, 152f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Micorriza arbuscular. 2. *Glomus clarum*.
3. *Jatropha curcas*. 4. Fotossíntese. 5. Stress oxidativo.
6. Biomassa vegetal. 7. Enzimas. 8. Biodiesel. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

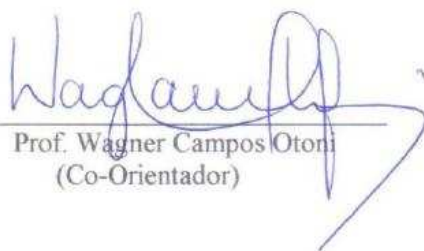
CDD 22. ed. 579.5

MURIEL DA SILVA FOLLI PEREIRA

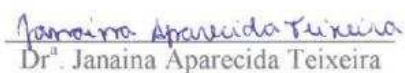
**FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR E GLICINA BETAÍNA AUMENTAM A
TOLERÂNCIA DE PINHÃO-MANSO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE
ABIÓTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2012


Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-Orientador)


Prof. Alessandro Coutinho Ramos


Dr.ª Janaina Aparecida Teixeira


Dr. Elcio Meira da Fonseca Júnior


Prof.ª Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

Ao meu amado esposo, Sidnei Samuel Pereira, por todo amor, dedicação e companheirismo.

Aos meus pais: Eldemir Angelo Folli e Maria Rosa da Silva Folli: exemplos de vida e honestidade. Meus primeiros e eternos professores.

MINHA HOMENAGEM

A DEUS, acima de tudo

Às minhas irmãs

À amiga Telma

Aos meus familiares

Aos meus amigos

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me proporcionado esta oportunidade, dando-me coragem e força nos momentos de maior provação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo; ao Departamento de Relações Exteriores e Comércio Internacional do Canadá (DFAIT) pelo auxílio financeiro durante o doutorado sanduíche e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto (CAG 12/09).

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, pelos ensinamentos, por seu exemplo de ética e cidadania, por sua dedicação à profissão, não descuidando da sua família. Por confiar na minha capacidade, pela amizade, cuidado e, sobretudo, sua paciência em todos os momentos. Agradeço por todas as oportunidades, meu grande exemplo de vida!

Ao professor Damase Khasa, da Université Laval, por toda ajuda, pela pessoa maravilhosa que representa para muitos e por ter me recebido de maneira tão generosa em seu Laboratório durante o período em que estive no Canadá.

À Marie-Ève, Estelle, Jessika, Nazima e Tran pela amizade, convívio e aprendizado que me proporcionaram durante minha estadia na Université Laval.

Aos professores Wagner Campos Otoni e Denise Mara Soares Bazzolli pela orientação, amizade, sugestões e contribuição para realização do trabalho. Ao professor Alessandro Coutinho Ramos, Dr^a Janaina Aparecida Teixeira e Dr. Élcio Meira da Fonseca Júnior pelas correções e sugestões.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos, pelas excelentes aulas e o conhecimento transmitido.

Ao meu esposo Sidnei, que mesmo longe fisicamente, sempre esteve muito próximo. O meu afetuoso agradecimento por ser o marido maravilhoso e dedicado que

é. Por todo amor e carinho, pela compreensão, confiança e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, meu eterno amor!

Aos meus pais, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais – como, por exemplo, amor, fé, compreensão, alegria – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Às minhas irmãs Geisibel e Andrea, pelo amor, pelo carinho e por torcerem sempre por mim.

Aos colegas do Laboratório de Associações Micorrízicas: André Luiz Bhering, André Luiz Moreira, André Marcos, Bruno, Cintia, Emiliane, Felipe, Fernanda, Gilberto, Guilherme Igor, José Maria, Juliana, Laélia, Leila, Lydice, Maíra Pereira, Maira Mariz, Mariana, Marliane, Mateus Dias, Matheus Loureiro, Melissa, Nina, Sabrina, Sirlaine, Thalita, Thiago, Tomás e Victor Hugo pela amizade e convívio, entendimento e apoio nos momentos de dificuldade, especialmente à Daniele Ruela, Flávia Mendes, Élcio e Ana Lúcia pelo auxílio na condução dos experimentos.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial ao Danilo, Sr. Paulo, Evandro, Nilcéa, Aline, Sr. Sebastião e Sr. Custódio, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda e paciência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais esta etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

MURIEL DA SILVA FOLLI PEREIRA, filha de Eldemir Angelo Folli e Maria Rosa da Silva Folli, nasceu na cidade de Vitória-ES, no dia 18 de fevereiro de 1984.

Em junho de 2002, ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), graduando-se em Engenharia Florestal em agosto de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou a Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo em julho de 2008. Neste mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado no mesmo programa de Pós-Graduação, concluindo em junho de 2012.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA (normas da Revista Brasileira de Ciência do Solo).....	8
CAPÍTULO II (normas da revista Applied Energy).....	50
GLICINA BETAÍNA E <i>Glomus clarum</i> ALTERAM A ALOCAÇÃO DE NUTRIENTES E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PLANTAS DE <i>Jatropha curcas</i> SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO	50
RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3. RESULTADOS	54
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO III (normas da revista Plant, Cell and Environment)	71
GLICINA BETAÍNA E MICORRIZA ARBUSCULAR ALTERAM A ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E A EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM PLANTAS DE <i>Jatropha curcas</i> SOB ESTRESSE HÍDRICO.....	71
RESUMO	71
1. INTRODUÇÃO.....	72
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3. RESULTADOS	78
4. DISCUSSÃO.....	79
5. CONCLUSÕES.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CAPÍTULO IV (normas da revista Plant Biotechnology Reports).....	97
METABOLISMO DE OXIGÊNIO REATIVO É ALTERADO PELA APLICAÇÃO FOLIAR GLICINA BETAÍNA E MICORRIZA ARBUSCULAR EM PLANTAS DE PINHÃO-MANSO SOB ESTRESSE HÍDRICO	97
RESUMO	97
1. INTRODUÇÃO.....	98
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
3. RESULTADOS	108
4. DISCUSSÃO.....	110
5. CONCLUSÕES.....	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
CAPÍTULO V (normas da revista New Phytologist).....	130
MICORRIZA ARBUSCULAR AUMENTA A BIOSÍNTESE DE GLICINA BETAÍNA ENVOLVIDA NA ADAPTAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Jatropha curcas</i> AO ESTRESSE AMBIENTAL.....	130
RESUMO	130
1. INTRODUÇÃO.....	131
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	134
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
4. CONCLUSÕES.....	140
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
CONCLUSÕES GERAIS.....	152

RESUMO

FOLLI-PEREIRA, Muriel da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2012. **Fungo micorrízico arbuscular e glicina betaína aumentam a tolerância de pinhão-mansão em condições de estresse abiótico.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Wagner Campos Otoni e Denise Mara Soares Bazzoli.

As associações micorrízicas arbusculares (MA) promovem melhorias no crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de baixa umidade, por possivelmente aumentarem as respostas das plantas ao déficit hídrico, podendo ser a glicina betaína (GB) um dos compostos induzidos relacionados à maior tolerância das plantas ao estresse hídrico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da MA e da aplicação exógena de GB no aumento de tolerância das mudas de *Jatropha curcas* ao estresse abiótico. Sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foram lavadas em água destilada esterilizada e desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 % (v/v) por 15 min. Em seguida foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada e tiveram o tegumento removido. Após a retirada do tegumento, as mesmas foram imersas em solução de NaOCl 4 % (v/v) por 15 min, seguidas de três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia esterilizada, e mantidas em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente. Quinze dias após a germinação, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos contendo substrato constituído de uma mistura de solo e areia (1:1, v/v) e inoculado com cubos de meio de cultura contendo hifas, raízes de cenoura transformada e 100 esporos do FMA *Glomus clarum*. Após 60 dias da inoculação, metade das plantas recebeu aplicação foliar de GB, durante quatro dias, e em seguida foram submetidas ou não ao estresse hídrico pela suspensão da irrigação durante dois dias. O estresse salino foi induzido pela aplicação de solução de NaCl 600mM ao substrato de crescimento das plantas por sete dias e o estresse térmico pela exposição das plantas à temperatura de 50 °C por 36 h. *G. clarum* e GB alteraram as respostas das plantas ao déficit hídrico. A alocação de biomassa para as raízes (ABR) foi maior, cerca de 26 %, em plantas com déficit hídrico, tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum* e naquelas bem irrigadas e tratadas com GB, enquanto que naquelas sem deficiência hídrica, tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum* esse valor foi menor que aproximadamente 19 %. As plantas inoculadas com *G. clarum* apresentaram alta eficiência em assimilar nutrientes, sendo este efeito mais acentuado sob condição de

estresse hídrico. A colonização com *G. clarum* e a adição de GB aumentou o conteúdo de potássio (K) em plantas sob déficit hídrico. Plantas inoculadas com *G. clarum* exibiram maior eficiência no uso da água quando submetidas ao estresse hídrico, diferentemente das plantas tratadas com GB, que apresentaram menor potencial hídrico foliar e foram menos eficientes no uso da água. Plantas tratadas com GB e colonizadas por *G. clarum* durante déficit hídrico exibiram ajustamentos significativos na captação e dissipação da luz e alta concentração de clorofila. Nas raízes, a colonização micorrízica reduziu acentuadamente a atividade da superóxido dismutase (SOD) em plantas sob estresse hídrico. A atividade das enzimas antioxidativas foi maior em plantas não micorrizadas do que em plantas micorrizadas (APX-ascorbato peroxidases e CAT-catalase), quando submetidas ao estresse hídrico. Reduções na atividade das enzimas POX (peroxidase), CAT e APX, em plantas micorrizadas não foram acompanhados por aumento nos teores de H₂O₂. Plantas de *J. curcas* mostraram-se, naturalmente, altamente tolerantes ao estresse hídrico, apresentando teores de espécies reativas de oxigênio (EROS) similares aos encontrados nas plantas bem irrigadas, tanto nas folhas quanto nas raízes. A inoculação micorrízica diminuiu os teores de H₂O₂ nas raízes e folhas das plantas sob estresse hídrico, indicando um menor acúmulo de EROS em mudas micorrizadas. A inoculação com *G. clarum* modificou a peroxidação de lipídeos nas raízes das plantas submetidas ao estresse hídrico. Nas folhas, o tratamento com GB aumentou a peroxidação de lipídeos nas plantas sob estresse hídrico que foram previamente inoculadas com *G. clarum*. Associação micorrízica arbuscular induziu ao aumento da expressão do gene *JcBD1*, que codifica a enzima betaína aldeído desidrogenase (uma importante enzima envolvida na biossíntese da glicina betaína), apenas quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico e salino e não quando as plantas foram expostas ao estresse térmico. Estas plantas que tiveram a expressão do gene *JcBD1* aumentada, acumularam mais GB nas células. Em conclusão, *G. clarum* pode amenizar e, simultaneamente, compensar as limitações de crescimento impostas por condições de déficit hídrico, pela influência que exerce sobre a expressão do gene envolvido na biossíntese da GB, desempenhando, portanto, um papel essencial na tolerância ao estresse e na produção de biomassa por *J. curcas*, podendo ser utilizado como fator de atenuação das consequências do estresse hídrico em plantas de *J. curcas*.

ABSTRACT

FOLLI-PEREIRA, Muriel da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2012. **Arbuscular mycorrhizal and the increased tolerance of seedlings of *Jatropha curcas* to abiotic stress.** Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Wagner Campos Otoni and Denise Mara Soares Bazzoli.

The arbuscular mycorrhizal (AM) promotes improvements in growth and development of the plants under low moisture due to increase the response to water deficit. This response could be the production of glycine betaine (GB) which is related to greater tolerance of plants to drought stress. The aim of this study was determine the potential of AM and foliar application of GB to increase resistance of *Jatropha curcas* seedlings to abiotic stress. Seeds of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) were washed in sterile distilled water and disinfested superficially in sodium hypochlorite solution (NaOCl) 4 % (v/v) for 15 min. Then were washed three times in sterile distilled water and had the integument removed. After removal of the integument, the seeds were immersed in a solution of NaOCl 4 % (v/v) for 15 min, followed by three successive washes in sterile distilled water. Later, were placed to germinate in trays containing sterile sand, were irrigated daily and kept in the greenhouse. Fifteen days after germination, seedlings obtained were transplanted to pots containing substrate soil and sand (1: 1, v/v) and inoculated with cubes of culture medium containing hyphae, carrot roots transformed and 100 spores of the AMF *Glomus clarum*. After 60 d, some plants were sprayed by GB in the leaves, for four days. After this time, the plants were submitted to drought stress by irrigation suspension for 2 d, to salinity stress by application of sodium chloride (600 mM) in the growth substrate for 7 d and to thermal stress by incubation the plants at 50 °C for 36 h. *G. clarum* and GB affected the response to drought stress. The biomass allocation for root was higher (~26%) in plants submitted to drought stress, GB-treated and inoculated with *G. clarum* or in those plants that were not submitted to drought stress, but GB-treated and inoculated with *G. clarum*. However, the plants not submitted to drought stress, GB-treated and inoculated with *G. clarum*, the biomass allocation was of 19%. The plants that were inoculated with *G. clarum* had high efficiency in the nutrients assimilation and, this effect is higher under drought stress condition. The colonization with *G. clarum* and GB application increased the potassium (K) content in plants that were submitted to drought stress. Furthermore, the plants inoculated had greater efficiency of the use of water when submitted to drought stress

than the plants with application of GB. The plants treated with GB and inoculated with *G. clarum* during the drought stress had significant adjustments in the capture and light dissipation and high chlorophyll concentration. In the roots, the mycorrhiza colonization decreased the superoxide dismutase (SOD) activity, but only in plants under drought stress. Activities of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in both leaves and roots was greater in *J. curcas* non-inoculated than in the plant inoculated when submitted to drought stress. The decreases in activities of peroxidase (POX), APX and CAT in *J. curcas* with mycorrhizal were not accompanied by increase in the H₂O₂ content. *J. curcas* showed be highly tolerant to drought stress, with similar to the reactive oxygen species (EROS) content to found in plants that were not submitted to drought stress. In some plants, the mycorrhizal decreased the H₂O₂ content in the leaves and roots under drought stress, and this indicate a smaller accumulation of EROS in seedlings with mycorrhizal. The colonization with *G. clarum* modified the lipid peroxidation in roots under drought stress. In leaves, the GB application increased the lipid peroxidation in the plants under drought stress that were previously inoculated with fungus. Only when plants were submitted to thermal stress, the AM increased the *JcBD1* gene expression and, these plants accumulated more GB. Therefore, *G. clarum* can decrease and, simultaneously, compensate the limitations of the growth under drought stress, by induce of the GB gene expression and thus the colonization with this fungus may be used for decrease the consequences of the water stress in the planting of *J. curcas*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Várias formas de simbiose são reconhecidas, incluindo associações micorrízicas arbuscular, ecto-, ericóide, arbutóide orquidóide (Smith e Read 2008). Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são fungos de solo formadores da relação mutualista mais comum na natureza, as micorrizas arbusculares, formadas entre estes e as raízes de aproximadamente 80% das plantas terrestres, com origem presumida a aproximadamente 460 milhões de anos atrás (Schüßler et al., 2001). Pertencem à ordem Glomerales dos Glomeromycota e estão agrupados em sete gêneros: Acaullospora, Archaeospora, Entrophospora, Glomus, Gigaspora, Paraglomus, e Scutellospora (INVAM, 2012).

O estabelecimento de associações micorrízicas arbusculares (MAs) confere às plantas uma gama de benefícios, sendo o principal desses, ou pelo menos o mais evidente até o momento, realizado pelo micélio extra-radicular do fungo e consiste na absorção de nutrientes obtidos de áreas localizadas além da zona de depleção da raiz, em especial fósforo, e translocação e disponibilização desses nutrientes para células do córtex de raízes das plantas. Diante de todos esses benefícios para as plantas os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), por conferirem um melhor status hídrico e nutricional às plantas, podem contribuir para uma maior tolerância das mesmas às condições de estresse abiótico (Tang et al., 2009; Asrar e Elhindi, 2011), resultando em crescimento mais rápido, com economia de insumos e redução da contaminação ambiental (Huang et al., 2009; Hernández-Ortega et al., 2012).

Os FMAs podem afetar o crescimento e produtividade da planta hospedeira sob condições de alta e baixa umidade (Borowicz, 2010; Abbaspour et al., 2012), podendo aumentar respostas da planta ao déficit hídrico moderado por vários mecanismos, destacando-se: aumento da absorção de água a partir do solo pelas hifas (Augé et al., 2003); alteração dos níveis hormonais causando mudanças na condutância estomática

(Augé et al., 2008); aumento da turgescência foliar e redução do potencial osmótico (Wu et al., 2006); e melhoria da nutrição da planta hospedeira (Folli-Pereira et al., 2012).

Além de todos os efeitos benéficos para as plantas sob condições de estresse já citados, os FMAs tornam o sistema radicular mais vigoroso e estimulam a produção de hormônios vegetais pelas plantas (Yao et al., 2005). Assim, o aumento da tolerância das plantas ao estresse hídrico e/ou salino pode estar relacionado ao aumento na expressão de genes responsivos ao estresse.

Os organismos aeróbios, durante o seu metabolismo normal, convertem o oxigênio molecular a espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxil ($\cdot OH$) (Selote et al., 2004). Essas EROS reagem com macromoléculas e causam danos celulares (Bailey-Serres, 2006). Em plantas, os sistemas antioxidativos inativam as EROS e protegem as células contra os danos causado pelo estresse oxidativo (Azcón et al., 2009).

Em alguns organismos, a atividade e a expressão diferencial de genes que codificam enzimas antioxidativas encontram-se relacionadas às condições de estresse. O aumento da atividade dessas enzimas tem sido relacionado ao estresse hídrico (Porcel et al., 2003), à presença de metais pesados (Azcón et al., 2009), à exposição a xenobióticos (Tang et al., 2009) e ao estresse de temperatura (Zhang et al., 2003).

Pelo envolvimento das enzimas do antioxidativas na proteção contra os danos provocados pelo aumento da produção de EROS durante condições de estresse, os FMAs podem aumentar a capacidade das plantas em resistir a estresses ambientais e oxidativos, proporcionando maior tolerância às EROS, apesar de o papel dessas enzimas em micorrizas ser pouco elucidado. Porcel et al. (2003) e Ruiz-Lozano (2003) apresentaram uma hipótese, segundo a qual FMAs protegem as plantas hospedeiras contra danos oxidativos devido a incrementos de enzimas antioxidativas.

Sob condições de déficit hídrico, as plantas tentam manter o seu índice de água acumulando solutos compatíveis, não tóxicos, que não interferem nos processos fisiológicos normais da planta. Alguns desses compostos são a prolina e a glicina betaína (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008). O acúmulo desses solutos é um índice fisiológico sensível de plantas em responder ao sal e outros estresses (Peng et al., 2008). Para as plantas sobreviverem sob condições de estresse salino, térmico e hídrico, o ajuste do potencial osmótico foliar é muito importante e exige equilíbrio osmótico intracelular. Assim, sob estresse hídrico e salino, as plantas acumulam alguns solutos orgânicos (prolina, açúcares solúveis, glicina betaína, entre outros) e íons inorgânicos para manter maior ajustamento osmótico (Yang et al., 2009).

Glicina betaína (GB) atua como um osmólito protetor não tóxico durante períodos de déficit hídrico em muitos organismos, incluindo algas, bactérias, plantas superiores e animais (Treberg e Driedzic, 2007). É sintetizada em elevadas taxas em muitas espécies de plantas em resposta aos vários tipos de estresses ambientais, atuando não apenas como um osmoprotetor, mas também na estabilidade de membranas e proteínas (Oishi e Ebina, 2005). Esse composto parece ser um determinante crítico da tolerância ao estresse. Seu acúmulo é induzido sob condições de estresse e esse acúmulo é correlacionado com o nível da tolerância (Wu et al., 2008).

As plantas sintetizam GB por duas reações de oxidação da colina (Rhodes e Hanson, 1993). A primeira reação catalisada por uma colina monooxigenase ferredoxina - dependente (CMO) e a segunda etapa por uma betaína aldeído desidrogenase NAD⁺ - dependente (BADH) (Chen e Murata, 2002; Rontein et al., 2002). A síntese se dá a partir de colina ou glicina, por duas vias distintas: desidrogenação da colina ou N-metilação da glicina (Rhodes e Hanson, 1993). Para quase todos os sistemas biológicos, incluindo a maioria das plantas e micro-organismos, a biossíntese de GB é realizada

pela conversão da colina a GB em dois passos: uma oxigenação e uma desidrogenação passando por um intermediário instável (betaína aldeído).

O acúmulo de GB é associado a uma regulação positiva da expressão do gene para CMO e para BADH concomitantemente, assim conduzindo a uma atividade enzimática elevada.

Apesar dos relatos mencionados anteriormente, os estudos sobre possíveis relações entre MAs e GB são ainda escassos e contraditórios. Tanto quanto se sabe, nenhum estudo foi realizado com o intuito de avaliar se os FMAs alteram a expressão do gene codificante da enzima BADH (JcBD1). Fica evidente a necessidade de se realizar estudos nesta linha de pesquisa não só pelas dúvidas existentes, mas também para tentar esclarecer o modo de ação das MAs na tolerância das plantas ao estresse. Além disso, pouco se sabe acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na tolerância de plantas de *J. curcas* ao estresse.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial da associação micorrízica arbuscular no aumento de tolerância das mudas de *J. curcas* ao estresse abiótico.

Para atingir este objetivo, foram avaliados em plantas de *J. curcas* submetidas ao estresse abiótico as seguintes variáveis:

- a) O efeito da inoculação com o FMA *G. clarum* no crescimento e acúmulo de nutrientes nas plantas.
- b) O efeito de *G. clarum* na alocação de nutrientes e biomassa.
- c) O efeito da inoculação de *G. clarum* e da aplicação de glicina betaína (GB) na fotossíntese e trocas gasosas.

d) A atividade de enzimas antioxidativas e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS).

e) Investigar se a inoculação com *G. clarum* altera a expressão do gene *JcBD1* (Betaína desidrogenase I), envolvido na biossíntese da GB.

f) O efeito da inoculação com o FMA *G. clarum* no crescimento, desenvolvimento e acúmulo de glicinabetaína (GB) nas plantas submetidas ao estresse abiótico.

3. REFERÊNCIAS

ABBASPOURA, H.; SAEIDI-SARB, S.; AFSHARIA, H.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Tolerance of Mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *J Plant Physiol* 169: 704-709, 2012.

ASRAR, A.W.; ELHINDI A, K.M. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J Biol Sci* 18: 93-98, 2011.

AUGÉ, R. M.; MOORE, J. L.; CHO, K.; STUTZ, J. C.; SYLVIA, D. M.; AL-AGELY, A.; SAXTON, A. M. Relating dehydration resistance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *J Plant Physiol* 160: 1147-1156, 2003.

AUGÉ, R. M.; TOLER, H. D.; SAMS, C. E.; NASIM, GHAZALA. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza* 18:115-121, 2008.

AZCÓN, R.; PERÁLVAREZ, M. C.; BIRO, B.; ROLDÁN, A.; RUÍZ-LOZANO, J.M. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl Soil Ecol* 41: 168-177, 2009.

BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 141: pp. 311, 2006.

BOROWICZ, V.A. The impact of arbuscular mycorrhizal fungi on strawberry tolerance to root damage and drought stress. *Pedobiologia* 53: 265-270, 2010.

CHEN, T.H.H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5: 250-257, 2002.

FOLLI-PEREIRA, Muriel da Silva ; MEIRA-HADDAD, L.S. ; Rassol, N. ; OTONI, W. C. ; KASUYA, M.C.M. Development of mycorrhized vitroplants of *Jatropha curcas* L. at different rooting stages. *Plant Biotechnol Rep* 2012. DOI: 10.1007/s11816-012-0232-5.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, H.A.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; ZAVALETA-MANCERA, H.A.; LÓPEZ-DELGADO, H.A.; MENDOZA-LÓPEZ, M.R. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *J Environ Manage* 95: 319-324, 2012.

HUANG, H.; ZHANG, S.; WU, N.; LUO, L.; CHRISTIE, P. Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biol Biochem* 41: 726-734, 2009.

International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi – INVAM <http://invam.caf.wvu.edu> (2012).

MA, Q.Q.; WANG, W.; LI, Y.H.; LI, D.Q.; ZOU, Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *J Plant Physiol* 163: 165-175, 2006.

OISHI, H.; EBINA, M. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* 162: 1077-1086, 2005.

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

RHODES, D.; HANSON, A.D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 357-384, 1993.

RONTEIN, D.; BASSET, G. HANSON, A.D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab Eng* 4: 49-56, 2002.

RUIZ-LOZANO, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress, new perspectives for molecular studies. *Mycor* 13: 309-317, 2003.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105: 1413-1421, 2001.

SELOTE, DEVARSHI S.; BHARTI, S.; KHANNA-CHOPRA, R. Drought acclimation reduces O₂·⁻ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. *Biochem. Biophys. Res Comm* 314: 724-729, 2004.

SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press, London, 2008.

TANG, M.; CHEN, H.; HUANG, J.C.; TIAN, Z.Q. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol Biochem* 41: 936-940, 2009.

TREBERG, J.R.; DRIEDZIC, W.R. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 147: 475-83, 2007.

WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; XIA, R. X. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *Eur J Soil Biol* 42:166-172, 2006.

WU, W. Q.; SU, X.Y.; XIA, Y.; WANG, Y.S.; LUAN, L.J. An, *The Suaeda liaotungensis* kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica* 159: 17-25, 2008.

YANG, C.W.; XU, H.H.; WANG, L.L.; LIU, J.; SHI, D.C.; WANG, G.D. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica* 47: 79-86, 2009.

YAO, Q.; ZHU, H.H.; CHEN, J.Z. Growth responses and endogenous IAA and iPAs changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Sci Hortic* 105: 145-151, 2005.

ZHANG, L.; ONDA, K.; IMAI, R.; FUKUDA, R.; HORIUCHI, H.; OHTA, A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 308-314, 2003.

ZHANG, F-L.; NIU, B.; WANG, Y-C.; CHEN, F.; WANG, S-H.; XU, Y.; JIANG, L-D.; GAO, J.; WU, J.; TANG, L.; JIA, Y-J. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Sci* 174: 510-518, 2008.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

MICORRIZA ARBUSCULAR E A TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO ESTRESSE

RESUMO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são fungos de solo, biotróficos obrigatórios e formadores da simbiose mutualista mais comum na natureza: a micorriza arbuscular (MA). Esta associação ocorre nas raízes da maioria das plantas terrestres, promovendo melhorias no crescimento, desenvolvimento e aumento na tolerância e/ou resistência das plantas a vários agentes ambientais adversos. Além disso, os FMAs podem ser utilizados como potencial agente de controle biológico de doenças de plantas. Esses fungos produzem ainda, glomalina, uma proteína que desempenha papel fundamental na estabilidade do solo e bioestabilização de solos contaminados. As diferentes respostas das plantas a esta simbiose podem ser atribuídas à diversidade funcional das MAs, em função da interação FMAs-planta-condições ambientais. O estabelecimento e funcionamento da MA durante as condições de estresse envolve um complexo processo de reconhecimento e desenvolvimento, concomitantemente às alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares em ambos os simbiontes. Além disso, a colonização micorrízica das raízes tem impacto significativo na expressão de genes de diversas plantas que codificam proteínas presumivelmente envolvidas na tolerância ao estresse. Neste contexto, considerando que os FMAs são essenciais no estabelecimento e adaptação das plantas em locais perturbados, nesta revisão serão

abordados os mecanismos fisiológicos e moleculares da associação MA responsáveis por essa adaptação e à maior tolerância das plantas aos estresses, tanto biótico como abiótico.

Termos de indexação: Fungos micorrízicos arbusculares, sinalização, diversidade funcional, glomalina.

SUMMARY: ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND PLANT TOLERANCE TO STRESS

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil fungi, biotrophic mandatory and form the most common mutualistic symbiosis in nature: the arbuscular mycorrhiza (MA). This association occurs in the roots of most plants, promoting improvements in the growth and development of plants and increase in tolerance and/or plant resistance to various adverse environmental agents. In addition, the AMF can be used as a potential biological control agent of plant diseases. These fungi produce, glomalin, a protein that plays a key role in the stability of the soil and stabilization of contaminated soils. The different responses of plants to this symbiosis can be assigned to the functional diversity of AM, depending of the interaction between AMF, plants and environmental conditions. The establishment and functioning of MAs during stress conditions involves a complex process of recognition and development, concurrently at physiological, biochemical and molecular changes in both symbionts. In addition, mycorrhizal colonization of roots has a significant impact on the gene expression of several plants that encode proteins presumably involved in tolerance to stress. In this context, whereas the AMF are essential in the establishment and adaptation of plants on disturbed sites, this review will be covered the molecular and physiological mechanisms of the association MA, responsible for this adaptation and greater tolerance of plants to biotic and abiotic stresses.

Index terms: arbuscular mycorrhizal fungi, signaling, functional diversity, glomalin.

INTRODUÇÃO

Várias formas de simbiose são reconhecidas, incluindo associação micorrízica arbuscular, ecto-, ericóide, arbutóide orquidóide (Smith & Read, 2008). Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) formam uma das associações mais comuns na natureza, a micorriza arbuscular (MA), formada entre estes fungos e as raízes de aproximadamente 80% das plantas terrestres, com origem presumida a aproximadamente 460 milhões de anos atrás (INVAM, 2012).

A capacidade de formar MA é restrita a fungos pertencentes a cinco famílias (Gigasporaceae, Glomeraceae, Acaulosporaceae, Paraglomaceae e Archaeosporaceae) da ordem Glomerales do filo Glomeromycota (Stürmer & Siqueira, 2006), das quais são conhecidas cerca de 140 espécies, distribuídas em apenas sete gêneros (Acaullospora, Archaeospora, Entrophospora, Glomus, Gigaspora, Paraglomus e Scutellospora) (INVAM, 2012).

Plantas em simbiose micorrízica sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionadas com o sistema de defesa da planta para que a simbiose seja estabelecida (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). Estas respostas, entretanto, são limitadas, transientes e restritas a células específicas, mas as reações nas plantas têm semelhanças, do ponto de vista fisiológico, com as reações que se observam durante a infecção por patógenos (Lambais et al., 2003).

Nas associações micorrízicas ocorre uma íntima interação entre os parceiros, apresentando uma perfeita integração morfológica e fisiológica, resultando em uma alta compatibilidade funcional. A planta beneficia-se pelo aumento da absorção de água e

nutrientes, principalmente de fósforo (P), proporcionado pelas hifas fúngicas, que funcionam como extensão do sistema radicular, enquanto o fungo é beneficiado pelos fotoassimilados das plantas e permitem o completo ciclo de vida dos FMAs que só ocorre em associação com a planta hospedeira (Smith & Read, 2008). Embora essa simbiose seja muitas vezes considerada mutualista, pois há troca benéfica entre os FMAs e a planta, o efeito líquido sobre a aptidão da planta pode variar de mutualista a parasitário, dependendo das condições ecológicas e combinações fungo-planta (Kiers et al., 2006).

Sob diversas condições de estresse, a maioria das plantas superiores é colonizada por FMAs, beneficiando o seu crescimento (Smith & Read, 2008). Sendo assim, os FMAs são críticos no estabelecimento e adaptação das plantas em locais severamente perturbados (Vallino et al., 2006), reduzindo as perdas por estresse (Munier-Lamy et al., 2007). Os FMAs afetam também as características físico-químicas do substrato e contribuem para a formação e manutenção da estrutura do solo, agregando as partículas do solo por meio de hifas extraradiculares e de seus exsudatos e resíduos. Além disso, os FMAs produzem e secretam a proteína glomalina (Rillig, 2004), que desempenha papel fundamental na estabilidade do solo (Bedini et al., 2009).

O estabelecimento de associações micorrízicas resulta em aumento da tolerância das plantas a estresses ambientais (Tang et al., 2009b). No entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares responsáveis por essa maior tolerância.

DIVERSIDADE FUNCIONAL EM ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR COMO UM IMPORTANTE FATOR NA TOLERÂNCIA A CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Diversidade funcional das micorrizas arbusculares (MAs) tem sido, frequentemente, definida em termos de respostas no crescimento das plantas, que podem variar de efeitos negativos a positivos, dependendo da combinação particular fungo-planta e das condições ambientais (Johnson et al., 1997). Esta diversidade pode ser medida pela porcentagem de colonização micorrízica, absorção de nutrientes e efeitos sobre o crescimento das plantas. As plantas respondem de modo diferenciado a diferentes FMAs, sendo estas respostas observadas tanto entre isolados de FMAs pertencentes a diferentes espécies, bem como entre isolados de uma mesma espécie (Munkvold et al., 2004; Smith et al., 2004).

Um importante assunto a ser tratado é a questão da utilização desta diversidade pelas plantas e sua capacidade de selecionar FMAs ou combinações de FMAs que sejam mais benéficos em termos funcionais (Heijden et al., 2004). No entanto, ainda não está claro se as plantas são capazes de selecionar FMAs eficientes quanto à estimulação do seu crescimento. Dessa forma, é importante entender como o incremento da diversidade de FMAs no solo influencia as plantas e quais combinações planta-fungo ocorrem preferencialmente e são mais eficientes. Outro ponto a ser estudado é a inoculação de plantas com misturas de vários FMAs, reconstruindo a comunidade de FMAs que é encontrada no campo e, subsequentemente, monitorar o desempenho da planta. Estudos como estes podem revelar se a diversidade de espécies nas raízes das plantas está interligada com a diversidade funcional.

Dados sobre a variabilidade das funções ou a diversidade funcional dos FMAs foram obtidos de experimentos nos quais as plantas têm sido inoculadas com um único

isolado de FMA, avaliando o crescimento ou a absorção total de P pela planta. Tais experimentos não são totalmente relevantes para situações de campo, quando mais de uma espécie de FMA está geralmente presente em um único sistema radicular (Jansa et al., 2003).

Atualmente, o desafio é estabelecer comunidades mistas utilizando diferentes espécies de FMAs para verificar se as plantas são capazes de selecionar FMAs eficientes ou combinações de FMAs que sejam complementares em suas funções. No entanto, estudos dessa natureza são difíceis, devido à dificuldade para identificar os FMAs que estão colonizando as raízes, o que se torna um fator limitante para o entendimento do controle dessas relações. As consequências da colonização simultânea de uma planta por FMAs, funcionalmente diferentes, têm sido pouco exploradas (Lekberg et al., 2007; Maherali & Klironomos, 2007).

Pouyu-Rojas et al. (2006) sugeriram a existência de seletividade e compatibilidade simbiótica diferenciada, havendo combinações preferenciais na formação das MAs e resposta variável dependente do genótipo micorrízico envolvido na relação fungo-planta. Alguns estudos têm mostrado que uma dada espécie de FMA originada do mesmo solo coloniza diferentes espécies de plantas e seus padrões de esporulação são diferentes (Eom et al., 2000). Em alguns casos, a espécie que melhor promove o crescimento de determinada planta hospedeira pode retardar o crescimento de outra e esta relação benéfica ou parasitária vai depender da combinação fungo-planta e das condições ambientais (Smith & Read, 2008).

Igualmente, espécies individuais de FMAs podem variar bastante na sua resposta ao crescimento de diferentes espécies de plantas e estas variações podem ocorrer tanto entre isolados de FMAs pertencendo a diferentes espécies, bem como entre isolados da mesma espécie (Munkvold et al., 2004; Smith et al., 2004). Conseqüentemente, a presença ou a ausência de espécies particulares de FMAs e mudanças na estrutura da

população (Klironomos et al., 2000), bem como a sua diversidade global, podem influenciar a diversidade, a estrutura e a produtividade da comunidade de plantas (Heijden et al., 2004), tanto em estudos experimentais de casa de vegetação como também em ecossistemas naturais.

No estudo realizado por Hart & Klironomos (2002), a variação no crescimento de plantas foi maior entre as inoculadas com diferentes espécies de FMAs do que entre aquelas inoculadas com diferentes isolados da mesma espécie. Contudo, para esses autores, isso não significa que a variação dentro de isolados não é ecologicamente importante. Assim, alguns estudos indicam considerável variação dentro das espécies de FMAs.

Nos estudos realizados por Munkvold et al. (2004), grandes diferenças no crescimento e na absorção de P pelas plantas foram encontradas dentro de espécies de FMAs, destacando a importância do potencial ecológico da variação dentro de espécies. Hart & Reader (2002), testando o efeito de 21 isolados de FMAs sobre o crescimento de plantas, verificaram que as famílias também diferem nos benefícios conferidos às plantas hospedeiras, embora exista grande variação dentro e entre espécies e gêneros de FMAs. Esses estudos mostram que existe considerável diversidade funcional nos FMAs e que variações dentro de uma espécie podem ser maiores que entre diferentes espécies ou gêneros de FMAs.

O aumento da diversidade de FMAs na comunidade presente no solo pode aumentar as chances de estabelecimento de uma espécie de fungo mais eficiente para o crescimento das plantas. Dessa forma, torna-se importante conhecer a estrutura da comunidade de FMAs de determinado ambiente ou bioma e avaliar a diversidade funcional desses simbioses, visando estabelecer se há relação entre a diversidade de FMAs e os benefícios às plantas (Finlay, 2004).

SINALIZAÇÃO MOLECULAR, EXPRESSÃO GÊNICA E TRANSDUÇÃO DE SINAIS EM ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

A colonização das raízes por FMAs envolve uma série de eventos morfo-fisiológicos e bioquímicos que são regulados pela interação de plantas e fungos, bem como por fatores ambientais (Costa & Lovato, 2011). Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que melhoram a tolerância de plantas micorrizadas ao estresse abiótico ainda não estão claros, embora a maior absorção de nutrientes possa ser uma das razões, pela melhoria do estado nutricional da planta (Kafkas & Ortas, 2009).

O estabelecimento e funcionamento de MAs envolve um complexo processo de desenvolvimento, concomitantes com alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares em ambos simbiontes (Moreira & Siqueira, 2006). Um sistema de troca de sinais e respostas bioquímicas ocorre no estabelecimento da simbiose, envolvendo a expressão dos denominados “genes de simbiose” na planta e a emissão de sinais simbióticos pelo fungo (Parniske, 2004). Isso possibilita a regulação da expressão de genes de defesa da planta e a sincronização das mudanças morfológicas e fisiológicas no hospedeiro vegetal, fazendo assim com que o hospedeiro “permita” que a simbiose se estabeleça (Costa & Lovato, 2011).

O primeiro passo para o desenvolvimento da simbiose é o reconhecimento mútuo entre planta e fungo. A raiz libera moléculas sinais que estimulam a ramificação das hifas (Harrison, 2005), e o fungo libera sinais que induzem a ativação de genes específicos da simbiose na planta (Kozuta et al., 2003). O processo de colonização ocorre a partir do contato de hifas com as raízes das plantas e, em seguida, eventos morfológicos e bioquímicos específicos, regulados por ambos simbiontes e afetados por fatores abióticos, determinam o desenvolvimento da simbiose (Smith & Read, 2008).

Evidências sugerem que, assim como em interações planta-patógeno, proteínas vegetais são liberadas para o espaço apoplástico como reposta de defesa da planta à colonização fúngica entre os FMAs e seus hospedeiros (Suo & Leung, 2002). Os mecanismos de indução/supressão associados ao sistema de defesa vegetal desempenham importante papel na colonização e compatibilidade fúngica entre os FMAs e seus hospedeiros (García-Garrido & Ocampo, 2002). Assim, a colonização micorrízica estimula o sistema de defesa primário da planta ao ataque de patógenos, aumentando dessa forma a tolerância das plantas ao estresse biótico causado por doenças (Elsen et al., 2008; Vos et al., 2012).

Modificações na fisiologia da planta após a colonização micorrízica ativam mecanismos de defesa e pode explicar, pelo menos parcialmente, a diminuição da suscetibilidade das plantas a patógenos. Esses efeitos podem surgir através de mudanças na formação de lignina (Saldajeno et al., 2008), produção de compostos fenólicos (Zeng, 2006), aparecimento de novas isoformas das enzimas hidrolíticas, como, quitinase e β -1,3-glucanase (El-Khallal, 2007). Proteínas relacionadas à patogênese, acúmulos de fitoalexinas e lignificação da parede celular têm sido relatadas em plantas micorrizadas em locais distantes dos sítios de infecção, indicando assim, a ocorrência de resistência sistêmica (Selosse et al., 2004).

O efeito bioprotetor dos FMAs contra patógenos de plantas pode estar relacionado com a indução de resistência de forma localizada ou sistêmica (Pozo et al., 2002; Elsen et al., 2008). Quando colonizadas por FMAs, as plantas promovem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionados com o sistema de defesa da planta para que a simbiose seja estabelecida (García-Garrido & Ocampo, 2002; De Gara et al., 2003; Selosse et al., 2004).

Os modos de ação e estratégias envolvidos na supressão de patógenos pelas micorrizas podem ser sintetizados em quatro grupos: competição direta entre FMAs e

patógenos; regulação da população microbiana no solo em torno do sistema radicular; modificações no crescimento, nutrição e morfologia vegetal; e alterações de ordens bioquímicas e moleculares nos hospedeiros vegetais (Costa & Lovato, 2011).

Plantas com maior atividade de enzimas antioxidativas mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses, e as micorrizas induzem aumento da atividade das enzimas antioxidativas como peroxidase, catalase e superóxido dismutase (Lambais et al., 2003; Arfaoui et al., 2007).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) ocorrem normalmente no metabolismo celular; porém, sob condições de estresse biótico e abiótico podem ter produção aumentada e neste caso, tornam-se citotóxicas ao reagirem com outras moléculas, podendo causar sérios danos ao metabolismo normal através de danos oxidativos a lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Isso leva a mudanças na permeabilidade seletiva de bio-membranas (Hernandez et al., 2001; De Gara et al., 2003) e alterações na atividade de enzimas ligadas à membrana (del Río et al., 2006).

As EROs se formam naturalmente no interior das células, nos cloroplastos e mitocôndrias, como produtos secundários oriundos da fotossíntese e da respiração. Entretanto, podem ser produzidas em excesso, devido à condição de estresse, originando o fenômeno conhecido como “explosão oxidativa” (Matamoros et al., 2006; del Rio et al., 2006).

Plantas que aumentam a produção de enzimas antioxidativas mostram-se mais tolerantes a diferentes estresses, e as micorrizas podem induzir ao aumento da atividade dessas enzimas (Alguacil et al., 2003; Lambais et al., 2003; Selosse et al., 2004; Abdel Latef & Chaoxing, 2011). Em associações micorrízicas as EROs atuam como mensageiro secundário e alterações na expressão das enzimas antioxidativas, como peroxidases, estão relacionados com o desenvolvimento da simbiose (Borde et al.,

2011). Dessa forma, os FMAs podem aumentar a habilidade das plantas em resistir a estresses bióticos e abióticos, por permitir uma maior tolerância às EROs.

A indução de enzimas que eliminam EROs, como SOD (superóxido dismutase), PO (peroxidase) e CAT (catalase) é o mecanismo de desintoxicação mais comum de EROs que ocorre durante as respostas ao estresse oxidativo (Mittler, 2002). Em raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) colonizadas por *Glomus clarum*, SOD e CAT foram induzidas em raízes na fase final de desenvolvimento da simbiose sob baixo nível de P (Lambais et al., 2003).

Muitas análises moleculares têm sido feitas, focando alterações na expressão de genes durante os estágios iniciais do desenvolvimento de MAs e durante condições de estresses bióticos e abióticos. A expressão de genes codificando H^+ -ATPase de *Nicotiana tabacum* e *Medicago truncatula* foi observada em células contendo arbúsculos (Krajinski et al., 2002). As H^+ -ATPases transportam prótons para fora da célula com consumo de ATP podendo acidificar a interface planta-fungo (Guttenberger, 2000) e gerar o gradiente eletroquímico que pode atuar como força motora para a transferência de nutrientes planta-fungo, como proposto por Stitt (1998). Altos níveis de expressão de dois genes codificando H^+ -ATPase de *Glomus mosseae* também foram detectados durante o desenvolvimento intraradicular (Requena et al., 2003).

Embora poucas proteínas intrínsecas de membranas envolvidas no transporte de nutrientes tenham sido investigadas por técnicas moleculares, o conhecimento sobre outras proteínas de membranas com funções putativas e reguladas durante a simbiose micorrízica continua limitado (Valot et al., 2006).

A colonização das raízes das plantas por FMAs apresenta impacto significativo na expressão de genes de diversas plantas que codificam proteínas presumivelmente envolvidas na tolerância a metais pesados / desintoxicação (Repetto et al., 2003; Rivera-Becerril et al., 2002). Informações sobre a base molecular dos mecanismos de tolerância

dos FMAs a metais pesados estão disponíveis: a expressão do gene metalotioneína de *Gigaspora margarita* (BEG 34) é regulada em micélios simbióticos por Cu (Lanfranco et al., 2002) e níveis de transcrição maiores do gene transportador putativo de Zn (GintZnT1) da família de facilitadores de difusão de cátions (CDF) foram observados no micélio de *Glomus intraradices* durante a exposição ao Zn, indicando possível função desta enzima na proteção contra o estresse por Zn (González-Guerrero et al., 2005).

Tem sido observado aumento da regulação do gene que codifica o transportador ABC putativo (GintABC1) dependente de Cd e Cu no micélio extrarradicular de *G. intraradices*. GintABC1 codifica polipeptídeo com homologia à região N-terminal da subfamília das Proteínas de Multiresistência (PRM), dos transportadores ABC mostrando, portanto, que pode estar envolvido na desintoxicação de Cd e Cu no micélio extraradicular de *G. intraradices* (González-Guerrero et al., 2006).

Em abordagem mais abrangente a expressão diferencial de genes em raízes de tomate colonizadas por FMAs cultivadas em solo contaminado, verificou-se que o crescimento das plantas micorrizadas foi melhor do que nas plantas não inoculadas com FMAs (Ouziad et al., 2005). Esses autores analisaram a formação de transcritos de genes, possivelmente, envolvidos na tolerância a metais pesados, e entre os genes, alguns com produtos supostamente envolvidos no alívio ao estresse por metais pesados. Alguns foram fortemente expressos quando expostos a metais pesados, e estes genes são menos regulados pela simbiose com os FMAs. A colonização das raízes diminuiu a concentração de metais pesados nas células da planta a um nível insuficiente para induzir a expressão desses genes.

A HSP90, uma chaperona molecular, proteína abundante, evolutivamente conservada e altamente induzida por estresse, regula a maturação, transporte e degradação de uma variedade de proteínas (Cowen & Lindquist, 2005; Sangster & Queitsch, 2005). Em consonância com isso, o gene que codifica uma proteína do

choque térmico de 90 kD (hsp90) foi altamente expresso no micélio extraradicular de *G. intraradices* cultivado sob estresse por metal pesado (Hildebrandt et al., 2007). O produto deste gene pode contribuir para a estabilização e renaturação de proteínas desnaturadas, danificadas por EROS formadas pelo estresse por metal pesado.

O estresse oxidativo pode ser uma das principais causas da toxicidade de vários metais pesados. Os maiores níveis de indução de hsp90 no crescimento *in vitro* do micélio extraradicular foram obtidos com altos níveis de Cu, que estimulam a geração de radicais $\cdot\text{OH}$ altamente prejudiciais a partir de O_2^- e H_2O_2 , levando ao estresse oxidativo (Avery, 2001).

Glutathione S-transferases (GSTs) catalisam a conjugação da glutathione com uma variedade de compostos eletrofílicos reativos e podem oferecer proteção contra estresse oxidativo (Moons, 2003; Smith et al., 2004). O aumento da regulação transcricional do gene da glutathione S-transferase por Cd, Cu e Zn, pode indicar que GSTs participam da diminuição da toxidez por metais pesados no micélio simbiótico. As metalotioneínas (MTs) são proteínas de ligação a metais sintetizadas em ampla gama de organismos sob exposição a concentrações tóxicas de metais como Cu, Zn ou Cd (Kumar et al., 2005).

A expressão diferencial do gene da metalotioneína no micélio extraradicular de *G. intraradices* pelo estresse por Cu, em certa extensão por Zn, mas não por Cd, concorda plenamente com a função principal da proposta de MTs em fungos na desintoxicação do Cu. Esta opinião é corroborada pela regulação Cu-específicas de uma MT do FMA *G. margarita* (Lanfranco et al., 2002). No entanto, os níveis de transcrição do gene da metalotioneína foram comparativamente baixos no micélio extraradicular e em raízes micorrizadas de *Medicago truncatula* (Hildebrandt et al., 2007). Altos níveis de expressão do transportador de Zn são encontrados nas raízes, o que sugere que este gene é expresso, preferencialmente, nas estruturas intrarradiculares de *G. intraradices* e o

produto de seu gene pode desempenhar um papel mais específico na interface fúngica em plantas de *M. truncatula* (Hildebrandt et al., 2007).

Os FMAs dependentes da baixa regulação de genes de plantas potencialmente envolvidos na tolerância ao estresse por metais pesados e o concomitante aumento da expressão de genes relacionados ao estresse em FMAs indicam que o eficaz mecanismo(s) de tolerância à metais pesados em FMAs poderia dar uma contribuição fundamental para o aumento da tolerância a metais pesados de plantas micorrizadas (Ouziad et al., 2005).

A indução dos genes no micélio do FMA *G. intraradices*, que codificam a proteína de choque térmico e glutatona S-transferase na presença de metais pesados sugere que a tolerância ao estresse oxidativo induzido por metais pesados pode ser uma resposta primária em FMAs nestas condições (Hildebrandt et al., 2007).

Os FMAs em solos salinos podem minimizar as perdas de produção das plantas através do aumento da tolerância ao sal (ZhongQun et al., 2007). Os mecanismos subjacentes à tolerância à salinidade conferida pelos FMAs ainda não foram elucidados em nível molecular.

Tolerância de plantas à salinidade é uma característica complexa em que diversos fatores podem contribuir: a geração de osmoprotetores (glicina betaína, prolina, polióis) no citoplasma, fornecimento de energia por ATPases para a exportação de Na^+ e Cl^- , proteínas específicas de transporte para a transferência desses íons para o vacúolo ou para os espaços apoplásticos, abastecimento adicional de água mediada por aquaporinas para manter o balanceamento osmótico (Hasegawa et al., 2000). Além disso, qualquer estudo comparativo no campo é confrontado com o problema de que tais fatores são geralmente codificados por famílias de genes. Para antiporters Na^+/H^+ , por exemplo, seis membros já foram completamente sequenciados e pelo menos 40 outros são potenciais candidatos que já foram reconhecidos (Xia et al., 2002).

O genoma de *Arabidopsis* codifica 35 genes para aquaporina com 13 homólogos no subgrupo das proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP) (Jang et al., 2004). Assim, estudos sobre o impacto da colonização micorrízica sobre a expressão dos genes com produtos envolvidos na tolerância ao sal é confrontado com a multiplicidade e complexidade dos traços.

Em estudos de expressão gênica, pode-se concentrar somente em uns poucos genes que são aparentemente de importância primordial na tolerância à salinidade. Em uma abordagem com plantas micorrizadas de tomate cultivadas sob estresse induzido por NaCl (Ouziad et al., 2006), o gene que codifica aquaporina foi reprimido nas plantas. No entanto, a expressão de um gene transportador de Na^+/H^+ provavelmente envolvido na tolerância à salinidade permaneceu inalterada (Sottosanto et al., 2004).

Plantas podem responder ao estresse hídrico em níveis morfológicos, anatômicos e celulares com modificações que permitem que se evite o estresse ou aumente a sua tolerância (Bray, 1997). Uma das principais respostas de todos os organismos ao déficit hídrico é o ajustamento osmótico. Para enfrentar a seca, muitas plantas reduzem o potencial osmótico de suas células pela síntese e acumulação de osmólitos compatíveis, tais como prolina que participa da regulação osmótica (Kishor et al., 1995). No entanto, prolina também desempenha uma função importante como osmólito compatível protetor, eliminando as espécies reativas de oxigênio e facilitando a correção do potencial redox alterado pela reposição do fornecimento de NADP^+ (Hasegawa et al., 2000).

Acúmulo de prolina ocorre, principalmente, devido à síntese de novo, apesar de também uma reduzida taxa do catabolismo ter sido observado (Kishor et al., 1995). As duas primeiras etapas da biossíntese de prolina são catalisadas por Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) por meio de sua atividade γ -glutamil cinase e glutâmico- γ -semialdeído desidrogenase. Em seguida, o Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) formado é

reduzido por P5C redutase (P5CR) à prolina. A etapa limitante nessa via é representada pela atividade γ -glutamil cinase de P5CS, que é sensível à inibição por feedback por níveis relativamente baixos de prolina. Além disso, em *Arabidopsis*, o gene que codifica P5CS é induzido pela salinidade, estresse hídrico, e ABA, mas o gene *p5cr* que codifica P5CR não é induzido por esses fatores (Yoshihara et al., 1995). Assim, o gene que codifica P5CS é de importância fundamental para a biossíntese de prolina em plantas (Ábrahám et al., 2003).

Estudos sobre a osmorregulação na simbiose micorriza arbuscular são escassas e contraditórias, evidenciando que há aumento no acúmulo de prolina nas plantas micorrizadas submetidas ao déficit hídrico; entretanto, isto é variável com o FMA envolvido (Ruiz-Lozano & Azcón, 1997; Hasegawa et al., 2000).

Apesar do aumento na compreensão das relações hídricas em plantas micorrizadas e os processos fisiológicos envolvidos na maior tolerância das plantas micorrizadas à limitação de água, ainda há muitos aspectos desconhecidos que devem ser esclarecidos. A base molecular da tolerância ao estresse hídrico em plantas micorrizadas, por exemplo, continua longe de ser compreendida. O estabelecimento do padrão de expressão de genes tais como *p5cs* em plantas sob condições de estresse osmótico, deve proporcionar maior entendimento sobre o papel da simbiose micorriza arbuscular no processo de ajustamento osmótico durante o estresse hídrico.

FATORES RELACIONADOS À OCORRÊNCIA E AO AUMENTO DA TOLERÂNCIA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR

Simbiose entre as plantas e FMAs resulta na redução de perdas por fatores de estresses (Munier-Lamy et al., 2007) e, conseqüentemente, maior crescimento das plantas, com economia de insumos e redução da contaminação ambiental (Huang et al., 2009). Além disso, esses fungos podem atuar como agentes potenciais de controle biológico, amenizando os efeitos ou danos causados por fitopatógenos, provavelmente por meios indiretos, pois promovem melhor nutrição das plantas e aumento da resistência do sistema radicular.

Fungos micorrízicos arbusculares podem afetar o crescimento e produtividade da planta hospedeira sob condições de alta e baixa umidade (Borowicz, 2010). A resposta das plantas à colonização por FMAs depende da gravidade e da periodicidade de seca, além de outras condições edáficas. Assim, a simbiose com FMAs pode aumentar respostas da planta ao déficit hídrico moderado por vários mecanismos, destacando-se: aumento da absorção de água a partir do solo pelas hifas (Augé et al., 2003); alteração dos níveis hormonais causando mudanças na condutância estomática (Augé et al., 2008); aumento da turgescência foliar e redução do potencial osmótico (Wu et al., 2006); e melhoria da nutrição da planta hospedeira (Chen et al., 2005).

Plantas associadas aos FMAs tem frequentemente maior resistência ao estresse salino, talvez com maior consistência do que ao estresse devido à seca. Muitos pesquisadores têm relatado que os FMAs aumentam a tolerância das plantas ao estresse salino (Jahromi et al., 2008; He et al., 2007; Hajiboland et al., 2010) por melhorar a absorção de água e nutrientes pelas plantas (Asghari et al., 2005), equilíbrio iônico (Giri et al., 2007), e por proteger a atividade de enzimas (Rabie & Almadini, 2005). No

entanto, são poucos os estudos relacionados com a influência da inoculação de FMAs sobre a fotossíntese e relações hídricas durante o estresse salino. Alguns relatos indicam que a colonização micorrízica pode melhorar o conteúdo relativo de água nas folhas de abobrinha (Colla et al., 2008), potencial hídrico e fotossíntese de plantas de milho (Sheng et al., 2008), e a concentração de clorofila nas folhas de várias espécies de plantas (Sannazzaro et al., 2006; Colla et al., 2008).

A associação micorrízica pode aumentar o teor de clorofila das folhas e, normalmente, plantas micorrizadas, crescendo sob condições de estresse apresentam folhas mais verdes, sugerindo que o estresse interfere na síntese de clorofila (Colla et al., 2008). A inoculação micorrízica também aumenta a absorção de fósforo e magnésio e reduz as concentrações de sódio na planta, o que por sua vez, contribui para aumentar o teor de clorofila e, conseqüentemente, melhoria do desempenho geral das plantas micorrizadas sob condições de estresse (Sheng et al., 2008).

A salinidade afeta negativamente a formação e funcionamento da simbiose micorrízica (He et al., 2007), o que é evidenciado a redução da colonização das raízes das plantas por alguns FMAs na presença de NaCl (Giri et al., 2007), provavelmente devido ao efeito direto de NaCl sobre os fungos (Juniper & Abbott, 2006).

Sob condições de déficit hídrico, as plantas tentam manter o seu equilíbrio hídrico acumulando solutos compatíveis, não tóxicos, e que não interferem com os processos fisiológicos normais da planta (Taiz & Zeiger, 2006). Alguns desses compostos são a prolina e a glicina betaína (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008). O acúmulo desses solutos é um índice fisiológico sensível de plantas em responder ao sal e outros estresses (Peng et al., 2008).

Para as plantas sobreviverem sob condições de estresse hídrico e salino, o ajuste do potencial osmótico foliar é muito importante e exige equilíbrio osmótico intracelular. Assim, sob estresses hídrico e salino, as plantas acumulam alguns solutos orgânicos

(prolina, açúcares solúveis, glicina betaína, entre outros) e íons inorgânicos para manter maior ajustamento osmótico (Yang et al., 2009). Parece que a presença de FMAs nas raízes pode modificar o potencial osmótico das folhas assim como eles têm mostrado influenciar a composição de carboidratos e o nível de prolina.

Prolina é o osmólito compatível mais comum em plantas e desempenha importante função no aumento da adaptação das plantas à seca e à salinidade (Hasegawa et al., 2000). Além de ajuste osmótico, essa molécula possui outras funções propostas em tecidos de plantas osmoticamente estressadas: mantenedor e protetor da integridade da membrana plasmática (Hinch & Hagemann, 2004), fonte de carbono e nitrogênio e eliminador de radicais hidroxílicos. O acúmulo de prolina em plantas micorrizadas sujeitas à seca foi relatado, e os efeitos variáveis da colonização micorrízica sobre os níveis de prolina nas plantas sob estresse salino têm sido observados. Porém, na literatura levantada, até o presente não há informação a respeito da influência da colonização por FMAs neste acúmulo (Sannazzaro et al., 2007).

Além de todos os efeitos benéficos para as plantas sob condições de estresse já citados, os FMAs tornam o sistema radicular mais vigoroso e estimulam a produção de hormônios vegetais pelas plantas (Yao et al., 2005). Assim, o aumento da tolerância das plantas ao estresse hídrico e, ou salino pode estar relacionado ao aumento na expressão de genes responsivos ao estresse. Estudos mostram que níveis de ABA (ácido abscísico) acumulados nas células, estimulam a expressão de genes pelas rotas ABA- dependentes e ABA-independentes, estimulando, assim, a produção de prolina e glicina betaína (Taiz & Zeiger, 2006).

Glicina betaína atua como um osmólito protetor não tóxico durante períodos de déficit hídrico em muitos organismos, incluindo algas, bactérias, plantas superiores e animais (Treberg & Driedzic, 2007). É sintetizada em elevadas concentrações em muitas espécies de plantas em resposta aos vários tipos de estresses ambientais, atuando

não apenas como um osmoprotetor, mas também, na estabilidade de membranas e proteínas (Oishi & Ebina, 2005). Esse composto parece ser um determinante crítico da tolerância ao estresse. Seu acúmulo é induzido sob condições do estresse e correlacionado com o nível da tolerância (Wu et al., 2008).

Apesar do acúmulo induzido de prolina em plantas sob estresse ter sido observado (Andrade et al., 2009; Fariduddin et al., 2009), os resultados sobre os efeitos da simbiose micorrízica nos teores deste osmólito ou de aminoácidos solúveis em condições de estresse, ainda são escassos ou nulos. Andrade et al. (2010), constataram que aminoácidos solúveis e o conteúdo de prolina das folhas de feijão, micorrizadas e não micorrizadas, aumentaram em resposta à adição de Cu ao solo, sugerindo uma resposta de estresse semelhante ao excesso desse metal no solo. No entanto, teores de prolina nas folhas das plantas micorrizadas mostrou aumento mais pronunciado em resposta ao Cu no solo, quando comparadas aquelas não-micorrizadas. Resultado este indicativo do possível papel deste aminoácido em plantas micorrizadas em resposta a toxicidade de Cu, que apresentaram maior acúmulo de biomassa.

O papel da associação micorrízica na atenuação do estresse causado por metais pesados em plantas crescendo em solos contaminados tem sido reconhecido (Göhre & Paszkowski, 2006). Melhoria do status nutricional e reduzida ou alterada absorção de metais, estão entre os maiores benefícios relacionados à associação micorrízica em plantas hospedeiras sob estresse com metais (Andrade et al., 2008).

FMA's podem alterar a concentração de metais em plantas pela imobilização nos componentes da parede celular de hifas intra ou extra radiculares, quelação do metal por compostos secretados pelos FMA's, como glomalina (Vodnik et al., 2008) ou compartimentação metálica no interior células fúngicas. Assim, estes fungos atuam como um filtro para o metal, reduzindo as concentrações locais nos solos e criando um

ambiente adequado para o crescimento das plantas em solos contaminados com metais (Göhre & Paszkowski, 2006).

A associação micorrízica pode alterar a absorção de metais pelas plantas (Toler et al., 2005; Andrade et al., 2008), com relatos tanto de aumento quanto de redução de suas concentrações em tecidos vegetais. Como consequência de alterações fisiológicas, plantas micorrizadas têm melhor desempenho sob condições de estresse de metal (Paradi et al., 2003).

Na literatura tem-se relatado vários mecanismos de desintoxicação em plantas, mas seu modo de ação em proteger as plantas, em associação ou não com FMAs, varia de planta para planta. Isso também é válido para o metal utilizado, a concentração aplicada, órgão da planta, e tempo de duração da exposição (Gratão et al., 2008).

Ao longo dos últimos anos, o uso de FMAs como potencial agente biorremediador por aumentar a tolerância das plantas a vários agentes adversos tem recebido atenção crescente. Tang et al. (2009b) verificaram que a inoculação de FMAs pode aumentar a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na rizosfera de *Zea mays*. Fatores de bioconcentração de fenantreno e pireno tendem a diminuir com o aumento das concentrações de fenantreno e pireno no solo. Hifas fúngicas que emanavam de raízes colonizadas por FMAs em solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo por mais de 16 semanas, serviram como transportadoras (Frey-Klett et al., 2007). Em outro estudo, Liu et al. (2004) mostraram que a inoculação de FMA poderia aumentar a atividade de enzimas no solo e, conseqüentemente a degradação da benzoapireno.

O manejo do solo e o estresse ambiental causam grande modificação de estruturação de comunidades fúngicas, alterando a distribuição e a dominância das espécies. Isso ocorre devido a alterações bióticas e abióticas do ambiente edáfico, como modificação na vegetação (raízes) e nas propriedades químicas do solo, especialmente, nos componentes da acidez, na disponibilidade de nutrientes, água, salinidade e

contaminação por metais pesados. Enquanto algumas espécies de *Acaulospora* são favorecidas pelo cultivo do solo nos Cerrados, as de *Scutellospora* e *Gigaspora* têm a presença diminuída pela interferência antrópica nesse ambiente (Moreira & Siqueira, 2006). A ocorrência das espécies de FMAs é muito variável, mas bastante diversa mesmo em solos degradados.

Como as micorrizas são sistemas biológicos compartimentalizados, sofrem enorme influência do ambiente e de inúmeros fatores edáficos de cada componente que influenciam de modo direto ou indireto a formação, o funcionamento e a ocorrência dessa simbiose. Os componentes e os fatores controladores apresentam interação constante e intensa de modo que a alteração em qualquer um deles exercerá influência sobre as micorrizas (Entry et al., 2002; Gucwa-Przepióra et al., 2007; Tang et al., 2009a; Martinez & Johnson, 2010).

A presença de metais pesados, em concentrações tóxicas no solo, exerce grande influência sobre os FMAs. Em excesso, reduz a germinação dos esporos, o crescimento micelial, o grau de colonização e a esporulação desses fungos, causando grande impacto na sua ecologia e diversidade (Klauber-Filho et al., 2005). Apesar desses efeitos, mais de 30 espécies de FMAs foram encontradas em várias regiões de solos contaminados e algumas com alta frequência, como *Paraglomus occultum*, *G. clarum*, *Glomus intraradices* e *Scutellospora pellucida*, além de colonização e esporulação abundantes. Mesmo em elevadas concentrações de metais tóxicos, têm sido relatadas altas taxas de colonização e densidade de esporos (Gaur & Adhoeya, 2004), mas em solos contaminados com Cd, Zn, Cu e Pb, a riqueza de espécies decresce com o nível desses metais no solo (Klauber-Filho et al., 2002).

Diversos estudos evidenciam o comportamento diferenciado de FMAs em relação ao excesso de metais no solo, sendo conhecidos vários isolados tolerantes a diversos metais contaminantes de solo. Considerando a importância desses fungos para a

ecologia das plantas, isolados tolerantes aos metais pesados são de grande interesse na revegetação de solos degradados pelo acúmulo desses elementos.

Weissenhorn et al. (1993) e Weissenhorn et al. (1994) avaliaram a tolerância de isolados de *Glomus mosseae* obtidos de áreas adjacentes, poluídas ou não com metais pesados (Cd e Zn) e, também, em relação a uma estirpe referência mantida em cultura de laboratório. Testes de germinação demonstraram que isolados obtidos de áreas contaminadas apresentaram maior tolerância à presença de metais pesados do que isolados obtidos de áreas contíguas não contaminadas, evidenciando que diferentes isolados de uma mesma “espécie” são funcionalmente distintos e apresentam capacidade de adaptação a mudanças antrópicas.

As respostas dos FMAs a metais pesados são diversas a nível de espécie ou mesmo ecótipo (Hildebrandt et al., 2007). Por exemplo, *Glomus etunicatum* foi encontrado sendo mais sensível ao Cd, Pb e Zn do que *Glomus intraradices* (Pawlowska & Charvat, 2004) e, *Glomus mosseae* isolado de solo poluído com metais pesados foi mais tolerante ao Cd do que a mesma espécie isolada de substrato não poluído (Weissenhorn et al., 1994).

Um bom entendimento da comunidade de FMAs sob estresse por metais pesados pode contribuir para o reconhecimento das interações entre os fungos e metais pesados, e futuramente para a revegetação ou fitorremediação em regiões poluídas por metais pesados (Hildebrandt et al., 2007). Estudos indicam que muitas espécies de plantas, tais como *Fragaria vesca*, *Viola calaminaria*, *Veronica rechingeri*, *Solidago gigante*, *Thymus polytrichus* e *Thlaspi praecox*, crescendo bem em áreas poluídas por metais pesados singulares foram colonizadas por diversos FMAs, e que estes FMA isolados podem atuar positivamente regulando a resistência das plantas a este tipo de estresse (Sonjak et al., 2009; Zarei et al., 2008).

Trabalhos realizados sobre FMAs em áreas preservadas e perturbadas mostram a importância desses fungos nos ambientes estudados (Caproni et al., 2005; Marinho et al., 2004; Mergulhão et al., 2007; Silva et al., 2005). Em caatinga nativa, na região de Xingó, AL, Souza et al. (2003) identificaram 24 táxons de FMAs, com maior representatividade em Acaulosporaceae e Glomaceae. Esses autores também observaram que os fungos formavam associação com a maioria das espécies vegetais encontradas, apesar das limitações climáticas da região.

Estudando a composição das comunidades de FMAs em áreas revegetadas com *Acacia mangium* após a mineração de bauxita na região de Porto Trombetas, no Pará, Caproni et al. (2005) verificaram que *Glomus clarum* Nicolson & Schenck e *Gigaspora margarita* Becker & Hall apresentavam características distintas de esporulação, indicando adaptações aos primeiros estágios de recuperação nas áreas degradadas pela mineração.

Em área de caatinga preservada e em área degradada por mineração de cobre, na Bahia, Silva et al. (2005) identificaram 15 espécies de FMAs e observaram, nas áreas impactadas, forte redução na diversidade vegetal e na comunidade de espécies de FMAs, afetada quantitativa e qualitativamente pela atividade mineradora. Em áreas salinizadas no Vale do São Francisco, em PE, Yano-Melo et al. (2003) identificaram 21 táxons de FMAs, com destaque para *Glomus mosseae* Gerdemann & Trappe e *Glomus intraradices*, e segundo os citados autores, o primeiro ciclo de multiplicação em cultura-armadilha favoreceu a esporulação dos FMAs, que decresceu a partir do segundo ciclo.

GLOMALINA NO SOLO E SUA IMPORTÂNCIA NO SISTEMA SOLO-PLANTA-MICROORGANISMO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE

Os FMAs também beneficiam as plantas por afetar as características físico-químicas do substrato e contribuírem para a formação e manutenção da estrutura do solo, agregando as partículas do solo por meio de hifas extraradiculares e de seus exsudatos e resíduos. Esses fungos produzem glomalina, uma glicoproteína do solo relacionada à glomalina (GRSP), que desempenha um papel fundamental na estabilidade da estrutura do solo (Bedini et al., 2009).

A glomalina contém cerca de 60% de carboidratos, possui N ligado ao oligossacarídeo, contém Fe, é insolúvel em água e apresenta alta hidrofobicidade, que pode contribuir para iniciar a agregação. A quantidade de glomalina imunorreativa extraível do solo apresenta alta correlação com a estabilidade dos agregados de solos de várias regiões do mundo (Rosier et al., 2006), podendo influenciar, indiretamente, o armazenamento de carbono do solo através da estabilização dos agregados do solo (Zhu & Miller, 2003). Estabilidade de agregados do solo é uma das propriedades mais importantes de controle de crescimento de plantas em ambientes áridos e semi-áridos por meio do controle do status hídrico solo-planta (Rillig, 2004).

Ao mesmo tempo em que são estabilizados pelas MAs, os agregados se tornam importante ambiente funcional e de proteção às hifas de FMAs no solo. Esse mecanismo resulta da ação de hifas, da produção de polissacarídeos extracelulares e de glomalina. Em solos degradados em recuperação, a melhoria na agregação é acompanhada pela maior quantidade de raízes finas colonizadas e hifas, que pela ação agregante, influenciam o diâmetro geométrico dos agregados. Como solos bem agregados são menos afetados pela erosão e mais favoráveis ao desenvolvimento das plantas, os efeitos das MAs na agregação contribuem para a produtividade e

sustentabilidade agrícola e para conservação e funcionalidade dos ecossistemas naturais (Finlay, 2004; Purin & Rillig, 2007).

As perdas de C no solo de ecossistemas incluem a lixiviação e erosão (Rillig & Mummey, 2006), e as unidades estruturais de solo estável (agregados) fornecem resistência contra esta erosão. A importância dos FMAs na redução de perdas por erosão está relacionada ao seu papel na agregação do solo (Rillig, 2004) e, conseqüentemente, na ciclagem de nutrientes, pela diminuição da lixiviação de C dos solos.

Metais pesados (MPs) estão associados a uma série de componentes do solo que determinam seu comportamento e influenciam a sua biodisponibilidade. Dependendo das propriedades condutivas do solo, metais pesados podem ser mantidos em diferentes fases da fração solo, tais como argilas minerais, ligados a óxidos de ferro e manganês, ligados a carbonatos e complexados à matéria orgânica do solo (MOS).

A fração orgânica do solo é muito complexa, porém o procedimento químico mais comumente aceito para especiação de metais pesados trata-os como um agrupamento. Extração dessa porção em uma única etapa negligencia a distribuição detalhada de metais entre frações orgânicas individuais. Alguns estudos sugerem que MPs se ligam, predominantemente, aos ácidos fúlvicos, sendo proporcional ao nível de poluição. Em contraste, a ligação é menos pronunciada em ácidos húmicos, em que uma quantidade limitada de sítios de sorção para os metais é assumida (Boruvka & Drabek, 2004). Substâncias húmicas, no entanto, não é a única fração da matéria orgânica com capacidade de ligação a MPs.

Na mistura de material orgânico insolúvel em sistema aquoso (humina) há diversos compostos que podem contribuir significativamente para o fenômeno de ligação de metais (Hayes & Clapp, 2001). Foi sugerido que um destes compostos é a glomalina, que foi detectada em grandes quantidades em numerosos solos (Nichols, 2003), o que tem sido atribuído ao fato de que os FMAs colonizam as raízes de aproximadamente

80% das espécies de plantas vasculares e tem distribuição global. Grandes “pools” de glomalina também podem resultar de sua alta persistência no solo (Rillig et al., 2001).

A quantificação de proteínas do solo relacionadas à glomalina (GRSP), um material protéico alcalino-solúvel ligado aos FMAs é definida pelas condições de extração (Nichols & Wright, 2006), cuja natureza bioquímica ainda não foi elucidada. GRSPs transferidas para o solo por meio do desprendimento de hifas (Driver et al., 2005), parecem ser um complexo de repetidas estruturas monoméricas unidas por interações hidrofóbicas (Nichols, 2003). Elas se ligam às partículas do solo e ajuda a estabilizar agregados (Rillig & Mummey, 2006). Além disso, contém ferro (0,04-8,8%) (Nichols, 2003), mas não compostos fenólicos como os taninos (Rillig et al., 2001).

GRSP podem estar ligadas a cátions em quantidades que variam em diferentes solos e, também, apresentam alta capacidade de ligação a alguns metais pesados (Cu, Pb e Cd), evidenciando-se que este sequestro pode ser importante para a bioestabilização em solos contaminados por MPs (González-Chávez et al., 2004; Nichols, 2003; Chern et al., 2007). Em trabalho realizado por Bedini et al. (2009), foi demonstrado que a quantidade de Cu, Ni, Pb e Co ligada à GRSP foi de, respectivamente, 2, 3, 0,83, 0,24, 0,24% do total do teor de MPs presentes em solo contaminado, reduzindo assim a biodisponibilidade de elementos tóxicos e, conseqüentemente, o estresse da planta por esses metais. Em outro trabalho realizado por Vodnik et al. (2008), foi demonstrado que GRSP representou 5,4-21,2% da matéria orgânica do solo contaminado por MPs. Neste caso, a quantidade de Pb ligado a GRSP variou de 0,69 a 23,4 mg.g⁻¹ (massa seca) da GRSP, que representava de 0,8-15,5% do total de Pb no solo.

A hipótese inicial, formulada por Wright et al. (1996), afirmou que a glomalina é secretada no solo pelos FMAs onde poderia ajudar na agregação do solo. Este modelo foi diretamente baseado na correlação observada entre as concentrações de GRSP com a estabilidade de agregados do solo em água. O aumento da agregação do solo

beneficiaria tanto o hospedeiro quanto os FMAs associados, o que justificaria o "custo" energético da produção glomalina.

Evidências experimentais sugerem que as relações entre a produção de glomalina, agregação do solo e melhoria do crescimento das hifas extraradiculares de FMA podem de fato existir (Bedini et al., 2010). No entanto, FMAs também parecem produzir GRSP em solos em que a matéria orgânica não é o principal agente de ligação do solo, e onde GRSP e agregação do solo não são correlacionados entre si (Rillig et al., 2003). Isto sugere que a promoção da agregação do solo pode não ser a função principal de glomalina. Além disso, as comunidades de FMAs e muitos outros grupos da biota do solo, lucram com uma estrutura melhorada do solo (Niklaus et al., 2003), o que torna talvez pouco provável que a promoção da agregação do solo seja a função primária da glomalina.

Há poucos relatos da ocorrência de proteínas do choque térmico (Hsp), que incluem chaperonas, em Glomeromycota, além de glomalina. Com o uso da espécie de FMA *G. intraradices*, Porcel et al. (2006) demonstraram a expressão de uma proteína Hsp de baixo peso molecular (30 kDa), que melhorou a tolerância das plantas ao estresse hídrico. Driver et al. (2005), utilizando sistema de cultivo *in vitro*, constataram que 80% da glomalina quantificada estava presente no micélio fúngico ao invés de no meio líquido de cultivo. Este resultado sugere que uma função primária da glomalina pode estar na subsistência do fungo, apesar do sistema utilizado ser um ambiente artificial. Essa noção é, naturalmente, apoiada pela constatação de que glomalina é homóloga da proteína putativa do choque térmico.

Com base nas observações anteriores, Purin & Rillig (2007) propuseram um novo modelo de função para a glomalina. Este modelo tem os seguintes componentes-chave: (a) glomalina tem (ou teve) uma função celular primária, como chaperonas. É sabido que algumas chaperonas tem a capacidade de atuar como sinal, resultando em aumento

da termotolerância e controle da viabilidade dos esporos; (b) outra função tem sido adquirida relativa à localização de proteínas de paredes e os efeitos sobre a compatibilidade do micélio; (c) a função ambiental no contexto da agregação do solo surgiu secundariamente, como um subproduto da função fisiológica primária.

CONCLUSÕES

Sob diversas condições de estresse, a maioria das plantas superiores são colonizadas por FMAs, que podem ter vários efeitos benéficos no crescimento da planta. Como as micorrizas são sistemas biológicos compartimentalizados, sofrem enorme influência do ambiente e de inúmeros fatores edáficos de cada componente que influenciam de modo direto ou indireto a formação, o funcionamento e a ocorrência das MAs. Os componentes e os fatores controladores apresentam interação constante e intensa de modo que alterações em qualquer um deles exercerá influência sobre as micorrizas. Poucos são os trabalhos que examinam com detalhes os fatores capazes de afetar a sobrevivência de FMAs específicos em seus habitats naturais. Ao contrário, os efeitos de fatores físico-químicos sobre as plantas são amplamente relatados. Estudos sobre os fatores que podem regular o estabelecimento e o funcionamento de MA e as alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares em ambos os simbioses durante condições de estresse biótico e abiótico têm sido realizados nos últimos anos. Entretanto, a elucidação desses mecanismos ainda está longe de ser concluída. A limitada informação sobre a genética dos FMAs e as dificuldades encontradas para a realização destes estudos, que é dificultado pelo simbiotrofismo obrigatório e pela complexidade genômica dos fungos, tem contribuído para limitação do conhecimento dessa simbiose.

LITERATURA CITADA

ABDEL LATEF, A.A.H. & CHAOXING, H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 127: 228-233, 2011.

ÁBRAHÁM, E.; RIGÓ, G.; SZÉKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C. & SZABADOS, L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 51: 363-72, 2003.

ALGUACIL, M.M.; HERNÁNDEZ, J.A.; CARAVACA, F.; PORTILLO, B. & ROLDÁN, A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiologia Plantarum*, 118: 562-570, 2003.

ANDRADE, S.A.L.; GRATÃO, P.L.; AZEVEDO, R.A.; SILVEIRA, A.P.D.; SCHIAVINATO, M.A. & MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 68: 198-207, 2010.

ANDRADE, S.A.L.; GRATÃO, P.L.; SILVEIRA, A.P.D.; SCHIAVINATO, M.A.; AZEVEDO, R.A. & MAZZAFERA, P. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. *Chemosphere*, 75: 1363-1370, 2009.

ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D.; JORGE, R.A. & de ABREU, M.F. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 1-13, 2008.

ARFAOUI, A.; EL HADRAMI, A.; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. & CHÉRIF, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 470-479, 2007.

ASGHARI, H.; MARSCHNER, P.; SMITH, S. & SMITH, F. Growth response of *Atriplex nummularia* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different salinity levels. *Plant and Soil*, 273: 245-256, 2005.

AUGÉ, R.M.; MOORE, J.L.; CHO, K.; STUTZ, J.C.; SYLVIA, D.M.; AL-AGELY, A. & SAXTON, A.M. Relating dehydration resistance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1147-1156, 2003.

AUGÉ, R.M.; TOLER, H.D.; SAMS, C.E. & NASIM, GHAZALA. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza*, 18: 115-121, 2008.

AVERY, S.V. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Advances in Applied Microbiology*, 49: 111-142, 2001.

- BEDINI, S.; PELLEGRINO, E.; AVIO, L.; PELLEGRINI, S.; BAZZOFFI, P.; ARGESE, E. & GIOVANNETTI, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1491-1496, 2009.
- BEDINI, S.; TURRINI, A.; RIGO, C.; ARGESE, E. & GIOVANNETTI, M. Molecular characterization and glomalin production of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing a heavy metal polluted ash disposal island, downtown Venice. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 758-765, 2010.
- BORDE, M.; DUHRANE, M. & JITE, P. Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. *Crop Protection*, 30: 265-271, 2011.
- BOROWICZ, V.A. The impact of arbuscular mycorrhizal fungi on strawberry tolerance to root damage and drought stress. *Pedobiologia*, 53: 265-270, 2010.
- BORUVKA, L. & DRABEK, O. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soils. *Plant, Soil and Environment*, 50:339-345, 2004.
- BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2:48-54, 1997.
- CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A.; BERBARA, R.L.L.; GRANHA, J.R.D.O. & MARINHO, N.F. Fungos micorrízicos arbusculares em estéril revegetado com *Acacia mangium*, após mineração de bauxita. *Revista Árvore*, 29: 373-381, 2005.
- CHEN, X.; TANG, J.J.; ZHI, G.Y. & HU S.J.. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology*, 28: 259-269, 2005.
- CHERN, E.C.; TSAI, D.W. & OGUNSEITAN, O.A. Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environmental Science and Technology*, 41: 3566-72, 2007.
- COLLA, G.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; TULLIO, M.; RIVERA, C.M. & REA, E. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology and Fertility of Soils*, 44: 501-509, 2008.
- COSTA, M.D. & LOVATO, P.E. Micorrizas arbusculares e a supressão de patógenos. In: KLAUBERG-FILHO, O.; MAFRA, A.L.; GATIBONI, L.C. (Ed.). *Tópicos em ciência do solo*. Viçosa: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011. p. 119-139.
- COWEN, L.E. & LINDQUIST, S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi. *Science*, 309: 2185-2189, 2005.
- DE GARA, L.; PINTO, M.C. & TOMMASI, F. The antioxidant systems vis-a-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:863-870, 2003.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M. & BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: Production, scavenging, and role in cell signaling. *Physiologia Plantarum*, 141:330-335, 2006.

DRIVER, J.D.; HOLBEN, W.E. & RILLIG, M.C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:101-106, 2005.

EL-KHALLAL, S.M. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors(jasmonic acid and salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1: 717-732, 2007.

ELSEN, A.; GERVASIO, D.; SWENNEN; R. & DE WAELE, D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza*, 18: 251-256, 2008.

ENTRY, J.A.; RYGIEWICZ, P.T.; WATRUD, L.S. & DONNELLY, P.K. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research*, 7: 123-138, 2002.

EOM, A.H.; HARTNETT, D.C. & WILSON, G.W. T. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, 122: 435-444, 2000.

FARIDUDDIN, Q.; YUSUF, M.; HAYAT, S. & AHMAD, A. Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in *Brassica juncea* plants exposed to different levels of copper. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 418-424, 2009.

FINLAY, R.D. Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, 18: 2004.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J. & TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176: 22-36, 2007.

GARCIA-GARRIDO, J.M. & OCAMPO, J.A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1377-1386, 2002.

GAUR, A. & ADHOLEYA, A. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86: 528-534, 2004.

GIRI, B.; KAPOOR, R. & MUKERJI, K.G. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology*, 54: 753-760, 2007.

GÖHRE, V. & PASZKOWSKI, U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115-1123, 2006.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S.F. & NICHOLS, K.A. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130: 317-23, 2004.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; AZCÓN-AGUILAR, C. & FERROL, N. 2006. GintABC1 and GintMT1 are involved in Cu and Cd homeostasis in *Glomus intraradices*. In: Abstracts of the 5th International Conference on Mycorrhiza, Granada, Spain.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; MOONEY, M.; VALDERAS, A.; MACDIARMID, C.W.; EIDE, D.J. & FERROL, N. Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 130-140, 2005.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P. & AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Annals of Applied Biology*, 153: 321-333, 2008.

GUCWA-PRZEPIÓRA, E.; MALKOWSKI, E.; SAS-NOWOSIELSKA, A.; KUCHARSKI, R.; KRZYZAK, J.; KITA, A. & RÖMKENS, P.F.A.M. Effect of chemophytostabilization practices on arbuscular mycorrhiza colonization of *Deschampsia cespitosa* ecotype Warynski at different soil depths. *Environmental Pollution*, 150: 338-346, 2007.

GUTTENBERGER, M. Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta*, 211:112-118, 2000.

HAJIBOLAND, R.; ALIASGHARZADEH, A.; LAIEGH, S.F. & POSCHENRIEDER, C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improve salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant and Soil*, 331: 313-327, 2010.

HARRISON, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Microbiology*, 59: 9-42, 2005.

HART, M.M. & KLIRONOMOS, J.N. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem functioning. In: VAN DER HEIJDEN, M.G.A. & SANDERS, I.R., ed. *Mycorrhizal Ecology*. Heidelberg, Springer-Verlag, 2002, p. 225-242.

HART, M.M. & READER, R.J. Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: variation due to differences in size of mycelium. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 357-366, 2002.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K. & BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology*, 51: 463-499, 2000.

HAYES, M.H.B. & CLAPP, C.E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science*, 166:723-37, 2001.

HE, Z.; HE, C.; ZHANG, Z.; ZOU, Z. & WANG, H. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 59:128-133, 2007.

HEIJDEN, M.G.A. van der; SCHEUBLIN, T.R. & BRADER, A. Taxonomic and functional diversity in arbuscular mycorrhizal fungi – is there any relationship? *New Phytologist*, 164: 201-204, 2004.

HERNADEZ, J. A.; TALAVERA, J. M.; MARTINEZ-GOMEZ, P.; DICENTA, F. & SEVILLA F. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiologia Plantarum*, 111: 313-321, 2001.

HILDEBRAND, U.; REGVAR, M. & BOTHE, H. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-146, 2007.

HINCHA, D.K. & HAGEMANN, M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochemical Journal*, 383: 277-283, 2004.

HUANG, H.; ZHANG, S.; WU, N.; LUO, L. & CHRISTIE, P. Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 726-734, 2009.

International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi – INVAM <http://invam.caf.wvu.edu>. Acesso em 08/02/2012.

JAHROMI, F.; AROCA, R.; PORCEL, R. & RUIZ-LOZANO, J.M. Influence of salinity on the in vitro development of *Glomus intraradices* and on the in vivo physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. *Microbial Ecology*, 55:45-53, 2008.

JANG, J.Y.; KIM, D.G.; KIM, Y.O.; KIM, J.S. & KANG, H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 54: 713-725, 2004.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; KUHN, G.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I.R. & FROSSARD, E. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications*, 13: 1164-1176, 2003.

JOHNSON, N.C.; GRAHAM, J.H. & SMITH, F.A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585, 1997.

JUNIPER, S. & ABBOTT, L.K. Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 16: 371-379, 2006.

KAFKAS, S. & ORTAS, I. Various mycorrhizal fungi enhance dry weights, P and Zn uptake of four *Pistacia* species. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 146-159, 2009.

KIERS, E.T. & van der HEIJDEN, G.A. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology* 87: 1627-1636, 2006.

KISHOR, P.B.; HONG, Z.; MIAO, G.H.; HU, C.A. & VERMA, D.P.S. Over expression OF D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, 108: 1387-94, 1995

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 6: 125-134, 2002.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; SOARES, C.R.F.S. & SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicação de FMAs em condições de excesso de metais pesados. In: *Tópicos em ciência do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 4: 85-144, 2005.

KLIRONOMOS, J.N.; MCCUNE, J.; HART, M. & NEVILLE, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters*, 3: 137-141, 2000.

KOZUTA, S.; CHABAUD, M.; LOUGNON, G.; GOUGH, C.; DENARIE, J.; BARKER, D.G. & BECARD, G.A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 131: 952-962, 2003.

KRAJINSKI, F.; HAUSE, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & FRANKEN, P. *Mtha1*, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology*, 4: 754-761, 2002.

KUMAR, K.S.; DAYANANDA, S. & SUBRAMANYAM, C. Copper alone, but not oxidative stress, induces copper-metallothionein gene in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 45-50, 2005.

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

LANFRANCO, L.; BOLCHI, A.; ROS, E.C.; OTTONELLO, S. & BONFANTE, P. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 130: 58-67, 2002.

LEKBERG, Y.; KOIDE, R.T.; ROHR, J.R.; ALDRICH-WOLFE, L. & MORTON, J. B. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *The Journal of Ecology*, 95: 95-105, 2007.

LIU, S.L.; LOU, Y.M.; DING, K.Q.; LI, H.; WU, L.H.; XING, W.Q.; SONG, J. & CAO, Z.H. Enhanced phytoremediation of benzo[a] pyrene contaminated soil with arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Pedologica Sinica*, 41: 336-342, 2004.

- MA, Q.Q.; WANG, W.; LI, Y.H.; LI, D.Q. & ZOU, Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *Journal of Plant Physiology*, 163: 165-175, 2006.
- MAHERALI, H. & KLIRONOMOS, J.N. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science*, 316: 1746-1748, 2007.
- MARINHO, N.F.; CAPRONI, A.L.; FRANCO, A.A. & BERBARA, R.L.L. Respostas de *Acacia mangium* Willd e *Sclerolobium paniculatum* Vogel a fungos micorrízicos arbusculares nativos provenientes de áreas degradadas pela mineração de bauxita na Amazônia. *Acta Botanica Brasílica*, 18: 141-149, 2004.
- MARTINEZ, T.N. & JOHNSON, N.C. Agricultural management influences propagule densities and functioning of arbuscular mycorrhizas in low- and high-input agroecosystems in arid environments. *Applied Soil Ecology*, 46: 300-306, 2010.
- MATAMOROS, M.A.; DALTON, D.A.; RAMOS, J.; CLEMENTE, M.R.; RUBIO, M. C. & BACANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 133:499-509, 2006.
- MERGULHÃO, A.C.E.S.; OLIVEIRA, J.P.; BURITY, H.A. & MAIA, L.C. Potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas nativas e impactadas por mineração gesseira no semi-árido brasileiro. *Hoehnea*, 34: 41-348, 2007.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410, 2002.
- MOONS, A. *Osgstu3* and *osgstu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Letters*, 553: 427-432, 2003.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2º Ed. Editora UFLA: Lavras, 2006. 729p.
- MUNIER-LAMY, C.; DENEUX-MUSTIN, S.; MUSTIN, C.; MERLET, D.; BERTHELIN, J. & LEYVAL, C. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass *The Journal of Environmental Radioactivity*, 97: 148-158, 2007.
- MUNKVOLD, L.; KJOLLER, R.; VESTBERG, M.; ROSENDAHL, S. & JAKOBSEN, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 164: 357-364, 2004.
- NICHOLS, K. Characterization of glomalin-a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. Ph D Dissertation. University of Maryland, College Park, Maryland 2003, 285 pp.
- NICHOLS, K.A. & WRIGHT, S.F. Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pools. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 215-220, 2006.
- NIKLAUS, P.A.; ALPHEI, J.; EBERSBERGER, D.; KAMPICHLER, C.; KANDELER, E. & TSCHERKO, D. Six years of in situ CO₂ enrichment evoke changes

- in soil structure and soil biota of nutrient-poor grassland. *Global Change Biology*, 9: 585-600, 2003.
- OISHI, H. & EBINA, M. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1077-1086, 2005.
- OUZIAD, F.; HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E. & BOTHE, H. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162: 634-649, 2005.
- OUZIAD, F.; WILDE, P.; SCHMELZER, E.; HILDEBRANDT, U. & BOTHE, H. Analysis of expression of aquaporins and Na⁺/H⁺ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 57: 177-186, 2006.
- PARADI, I.; BRATEK, Z. & LANG, F. Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus supply on polyamine content, growth and photosynthesis of *Plantago lanceolata*. *Plant Biology*, 46: 563-569, 2003.
- PARNISKE, M. Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 414-421, 2004.
- PAWLOWSKA, T.E. & CHARVAT, I. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environment Microbiology*, 70: 6643-6649, 2004.
- PENG, Y.L.; GAO, Z.W.; GAO, Y.; LIU, G.F.; SHENG, L.X. & WANG, D.L. Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 29-39, 2008.
- PORCEL, R.; AROCA, R.; CANO, C.; BAGO, A. & RUIZ-LOZANO, J.M. Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a 14-3-3 protein that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology*, 53: 575-582, 2006.
- PORCEL, R.; BAREA, J.M. & RUIZ-LOZANO, J.M. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, 157: 135-143, 2003.
- POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O. & SANTOS, J.G.D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com mudas de espécies arbóreas tropicais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 30: 413-424, 2006.
- POZO, M.J.; CORDIER, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; BAREA, J. M. & AZCÓN-AGUILAR, C. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 525-534, 2002.
- PURIN, S. & RILLIG, M.C. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, 51: 123-130, 2007.

- RABIE, G.H. & ALMADINI, A.M. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants. *African Journal of Biotechnology*, 4: 210-222, 2005.
- REPETTO, O.; BESTEL-CORRE, G.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist*, 157, 555-567, 2003.
- REQUENA, N.; REUNINGER, M.; FRANKEN, P. & OCON, A. Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology*, 132: 1540-1549, 2003.
- RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Canadian Journal of Soil Science*, 84: 355-363, 2004.
- RILLIG, M.C. & MUMMEY, D.L. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171: 41-53, 2006.
- RILLIG, M.C.; RAMSEY, P.W.; MORRIS, S. & PAUL, E.A. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil*, 253:293-9, 2003.
- RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F. & TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant and Soil*, 233: 167-177, 2001.
- RIVERA-BECERRIL, F.; CALANTZIS, C.; TURNAU, K.; CAUSSANEL, J.P.; BELIMOV, A.A.; GIANINAZZI, S.; STRASSER, R.J. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1177-1185, 2002.
- ROSIER, C.L.; HOYE, A.T. & RILLIG, M.C. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2205-2211, 2006.
- RUIZ-LOZANO, J.M. & AZCÓN, R. Effect of calcium application on the tolerance of mycorrhizal lettuce plants to polyethylene glycol-induced water stress. *Symbiosis*, 23: 9-22, 1997.
- SALDAJENO, M.G.; CHANDANIE, W.A.; KUBOTA, M. & HYAKUMACHI, M. Effects of interactions of arbuscular mycorrhizal fungi and beneficial saprophytic mycoflora on plant growth and disease protection. In: Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K, editors. *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. The Netherlands: Springer; 2008. p. 211-26.
- SANGSTER, T.A. & QUEITSCH, C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 86-92, 2005.

SANNAZZARO , A.I.; ECHEVERRÍA, MARIELA.; ALBERTÓ, E.O.; RUIZ, O.A. & MENÉNDEZ, A.B. Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 39-46, 2007.

SANNAZZARO, A.I.; RUIZ, O.A.; ALBERTO, E.O. & MENENDEZ, A.B. Alleviation of salt stress in *Lotus glaber* by *Glomus intraradices*. *Plant and Soil*, 285: 279-287, 2006.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E. & VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Compts Rendus Biologies*, 327: 639-648, 2004.

SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F. & HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18: 287-296, 2008.

SILVA, G.A.; TRUFEM, S.F.B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. & MAIA, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. *Mycorrhiza*, 15: 47-53, 2005.

SMITH, S.E. & READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press, London, 2008.

SMITH, S.E.; SMITH, F.A. & JAKOBSEN, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. *New Phytologist*, 162: 511–524, 2004.

SONJAK, S.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. & REGVAR, M. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant and Soil*, 314: 25-34, 2009.

SOTTOSANTO, J.B.; GELLI, A. & BLUMWALD, E. DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *Plant Journal*, 40: 752-771, 2004.

SOUZA, R.G.; MAIA, L.C.; SALES, M.F. & TRUFEM, S.F.B. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas de caatinga, na região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 26: 49-60, 2003.

STITT, M. Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica Acta* 111:167-175, 1998.

STÜRMER, S.L. & SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*. Wallingford: CABI-Pub., 2006. p.206-236.

SUO, Y. & LEUNG, D.W.M. Accumulation of extracellular pathogenesis-related proteins in rose leaves following inoculation of in vitro shoots with *Diplocarpon rosae*. *Scientia Horticulturae*, 93: 167-178, 2002.

- TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3 ed. Porto Alegre: Atmed, 2006.
- TANG, J.; XU, L.; CHEN, X. & HU, S. Interaction between C4 barnyard grass and C3 upland rice under elevated CO₂: Impact of mycorrhizae. *Acta Oecologica*, 35: 227-235, 2009a.
- TANG, M.; CHEN, H.; HUANG, J.C. & TIAN, Z.Q. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 936-940, 2009b.
- TOLER, H.D.; MORTON, J.B. & CUMMING, J.R. Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, Air, and Soil Pollution*, 164: 155-172, 2005.
- TREBERG, J.R. & DRIEDZIC, W.R. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 147: 475-83, 2007.
- VALLINO, M.; MASSA, N.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V.; BERTA, G. & BONFANTE, P. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Applied Environmental Microbiology*, 8: 971-983, 2006.
- VALOT, B.; NEGRONI, L.; ZIVY, M.; GIANINAZZI, S. & DUMAS-GAUDOT, E. A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. *Proteomics*, 6: 145-155, 2006.
- VOS, C.; BROUCKE, D.V.D.; LOMBI, V.M.; WAELE, D.D. & ELSEN, A. Mycorrhiza-induced resistance in banana acts on nematode host location and penetration. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 1-7, 2012.
- VODNIK, D.; GRČMANA, H.; MAČEKA, I.; VAN ELTERENB, J.T. & KOVAČEVIČ, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the total environment* 392: 130-136, 2008.
- WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (Am) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant and Soil*, 167: 189-196, 1994.
- WEISSENHORN, I.; LEYVAL, C. & BERTHELIN, J. Cd-Tolerant Arbuscular mycorrhizal (Am) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant and Soil*, 157: 247-256, 1993.
- WRIGHT, S.F. & UPADHYAYA, A. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161: 575-586, 1996.
- WU, Q.S.; ZOU, Y.N. & XIA, R.X. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *European Journal of Soil Biology*, 42: 166-172, 2006.

- WU, W.Q.; SU, X.Y.; XIA, Y.; WANG, Y.S. & LUAN, L.J. An, The Suaeda liaotungensis kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica*, 159: 17-25, 2008.
- XIA, T.; APSE, M.P.; AHARON, G.S. & BLUMWALD, E. Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na⁺/H⁺-antiporter in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 116: 206-212, 2002.
- YANG, C.W.; XU, H.H.; WANG, L.L.; LIU, J.; SHI, D.C. & WANG, G.D. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica*, 47: 79-86, 2009.
- YANO-MELO, A.M.; TRUFEM, S.F.B. & MAIA, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brazil. *Hoehnea*, 30: 79-87, 2003.
- YAO, Q.; ZHU, H.H. & CHEN, J.Z. Growth responses and endogenous IAA and iPAs changes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seedlings induced by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation. *Scientia Horticulturae*, 105: 145-151, 2005.
- YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y. & SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant Journal*, 7: 751-60, 1995.
- ZAREI, M.; KÖNIG, S.; HEMPEL, S.; NEKOU EI, M.K.; SAVAGHEBI, G. & BUSCOT, F. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution*, 156: 1277-1283, 2008.
- ZENG, R.S. Disease resistance in plants through mycorrhizal fungi induced allelochemicals. In: Inderjit KG, Mukerji, editors. *Allelochemicals: biological control of plant pathogens and diseases*. Dordrecht, Springer; 2006. p. 181-92.
- ZHANG, F-L.; NIU, B.; WANG, Y-C.; CHEN, F.; WANG, S-H.; XU, Y.; JIANG, L-D.; GAO, J.; WU, J.; TANG, L. & JIA, Y-J. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science*, 174: 510-518, 2008.
- ZHONGQUN, H.; CHAOXING, H.; ZHIBIN, Z.; ZHIRONG, Z. & HUAISONG, W. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59: 128-133, 2007.
- ZHU, Y.G. & MILLER, R.M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science*, 8: 407-409, 2003.

CAPÍTULO II

GLICINA BETAÍNA E *Glomus clarum* ALTERAM A ALOCAÇÃO DE NUTRIENTES E PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM PLANTAS DE *Jatropha curcas* SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO

As associações micorrízicas arbusculares (MA) promovem melhorias no crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de baixa disponibilidade de água por, possivelmente, favorecerem as respostas das plantas ao déficit hídrico, podendo ser a glicina betaína (GB) um dos compostos induzidos relacionados à maior tolerância nestas condições. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação exógena de GB e da inoculação de *Glomus clarum* na alocação de nutrientes e acumulação de biomassa em plantas de *Jatropha curcas* em condição de déficit hídrico. Plantas de *J. curcas* foram inoculadas ou não com esporos de *G. clarum*. Após 60 d da inoculação, metade das plantas recebeu aplicação foliar de GB, durante quatro dias. Após esse período, as plantas foram submetidas ou não ao estresse hídrico pela suspensão da irrigação. A alocação de biomassa para as raízes foi maior, cerca de 26 %, em plantas com déficit hídrico, tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum* ou naquelas bem irrigadas e tratadas com GB, enquanto que naquelas sem deficiência hídrica, tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum* esse valor foi menor que 19 %. A alocação de biomassa para as folhas (ABF) foi severamente afetada pela imposição do déficit hídrico que foi de 6,79 %, comparada com as plantas sem deficiência hídrica que foi de 32,27%. As plantas inoculadas com *G. clarum* apresentaram alta eficiência em assimilar nutrientes, principalmente fósforo (P), sendo este efeito mais acentuado sob condição de estresse hídrico. Colonização com *G. clarum* e GB aumentou o conteúdo de potássio (K) em plantas sob déficit hídrico. Em conclusão, *G. clarum* e GB podem

amenizar e, simultaneamente, compensar as limitações de crescimento impostas por condições de déficit hídrico, desempenhando, portanto, um papel essencial na tolerância ao estresse e na produção de biomassa por *J. curcas*.

Palavras- chave: FMA, *Glomus clarum*, Déficit hídrico, Biodiesel, Biomassa, Fósforo

1. INTRODUÇÃO

O benefício da associação micorrízica arbuscular (MA) na nutrição de plantas é bem conhecida [2]. Entretanto, essa associação pode resultar na redução de perdas por estresses [3, 4] e, conseqüentemente, favorecem o crescimento vegetal, com economia de insumos, em condições ambientais não ideais para o desenvolvimento das plantas.

Em muitas regiões áridas e semi-áridas, o estresse hídrico tem limitado a produtividade das culturas [6] e a inoculação com FMAs pode melhorar as relações hídricas de muitas plantas. Porcel e Ruiz-Lozano [7] verificaram que o potencial hídrico foliar foi maior em soja micorrizada do que em plantas correspondentes não micorrizadas. No entanto, os mecanismos pelos quais os FMAs melhoram a tolerância à seca e normalizam o fluxo de água nas plantas hospedeiras ainda não estão claros.

Em condições de déficit hídrico, alguns organismos, como algas, bactérias, plantas superiores e animais [8], apresentam mecanismos de ajustamento osmótico pela síntese de solutos orgânicos como a glicina betaína (GB). A GB é sintetizada em elevadas taxas em muitas espécies de plantas em resposta a vários tipos de estresses ambientais, por atuar não apenas como um osmólito, mas também na estabilidade de membranas e proteínas [9]. Seu acúmulo é induzido em condições de estresse sendo correlacionado com o nível de tolerância das plantas [10].

A função de GB no mecanismo de tolerância à seca ainda não foi perfeitamente compreendido. No entanto alguns trabalhos têm revelado resultados interessantes a

partir de experimentos com aplicação de GB e por produção de plantas geneticamente modificadas [11, 12]. De uma forma geral, plantas cultivadas sob baixa disponibilidade hídrica acumulam mais GB do que aquelas adaptadas ao cultivo irrigado [13].

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), uma planta considerada tolerante à seca por se desenvolver razoavelmente bem em solos pobres, necessita de boa fertilidade do solo e índices pluviométricos acima de 600 mm para a obtenção de alto potencial de produção de sementes [14]. A dependência micorrízica de *J. curcas*, apesar de reconhecida [3], ainda carece de estudos mais detalhados. No entanto, características atribuídas à cultura como rusticidade, tolerância à seca, baixa exigência nutricional, entre outras, podem estar relacionadas à produção de GB e, ou à dependência micorrízica dessa espécie.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de GB e da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares na alocação de biomassa e nutrientes em plantas de *J. curcas* sob condições de estresse hídrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Inóculo fúngico e cultura monoaxênica

Utilizou-se esporos de FMA, *Glomus clarum*, mantidos e meio M, pH 5,5 com 0,4 % de Fitagel (Bécard e Fortin, 1988), pertencente à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas/BIOAGRO/UFV.

2.2. Estratégia experimental e tratamentos aplicados

Sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foram lavadas em água destilada esterilizada e desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 % (v/v) por 15 min, seguidas de lavagem água destilada esterilizada e a remoção do tegumento. Após a retirada do tegumento, as mesmas foram imersas em solução de NaOCl 4 % (v/v) por 15 min, seguidas de três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia esterilizada, e mantidas em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente. Quinze dias após a germinação, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos contendo substrato esterilizado constituído de uma mistura de solo e areia (1:1, v/v) e inoculado com cubos de meio de cultura contendo hifas, raízes de cenoura transformada e 100 esporos do FMA *G. clarum*. No controle, as plantas foram transplantadas para vasos contendo cubos de meio de cultura com raízes de cenoura transformada sem FMA. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob luz natural. As plantas regadas diariamente e, quando necessário, aplicada solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), com metade da força para P.

Após 60 dias da inoculação com *G. clarum*, as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos hídricos (Tabela 1).

2.3. Massa vegetal, teor de nutrientes e colonização micorrízica

As massas frescas das folhas, caule e sistema radicular foram determinadas separadamente. Posteriormente, foram colocadas em estufas de ventilação forçada, a 70 °C até obtenção de massa constante para determinação da massa seca.

O material vegetal foi moído em moinho elétrico e digerido numa mistura nítrico-perclórica (3:1; v/v) para determinação dos teores de nutrientes. Os teores de Ca, Mg e Fe foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica; o teor de K, por fotometria de chama; e o P, colorimetricamente pelo método da vitamina C, modificado por Braga e Defelipo [18]. Também foram avaliados os teores de nitrogênio total pelo método micro Kjeldahl [19].

A colonização radicular por *G. clarum* foi estimada pelo método da contagem em placa marcada [20], após a descoloração e posterior coloração, conforme Giovannetti e Mosse [21].

A eficiência de utilização de nutrientes foi definida como a quantidade de biomassa produzida por unidade de nutrientes nos tecidos vegetais. Ela foi calculada pela relação: Biomassa/ % ou teor de Nutrientes [5].

Os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial, com seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, a 10% ou 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1. Colonização micorrízica e produção de biomassa

Plantas não inoculadas não apresentaram colonização por FMA. Todas as plantas inoculadas apresentaram alta porcentagem de colonização, sendo a menor porcentagem

de 85,3 %, observada em plantas inoculadas e que foram submetidas ao déficit hídrico e tratadas com GB (Figura 1).

Deficiência hídrica, aplicação foliar de GB, e inoculação com *G. clarum*, afetaram a produção e o acúmulo de biomassa (Figura 2). Maior parte da biomassa foi acumulada no caule de plantas de *J. curcas* e a imposição do estresse hídrico fez com que as plantas investissem mais na produção de biomassa para o caule. Quando submetidas a esta condição, a alocação de biomassa para o caule (ABC) foi maior. Acúmulo de biomassa nas folhas (ABF) reduziu-se com a imposição da deficiência hídrica. Micorriza arbuscular e GB contribuíram para maior alocação de biomassa para as raízes (ABR) durante a imposição do estresse hídrico (Figura 2).

3.2. Teores e eficiência no uso de nutrientes

A inoculação das plantas de *J. curcas* com *G. clarum* não aumentou o teor de N em plantas de *J. curcas*. Entretanto, plantas micorrizadas absorveram mais P, especialmente quando estavam sob déficit hídrico (Tabela 2). Déficit hídrico aumentou os teores de K, Ca e Mg nas plantas ($P < 0,1$), e a combinação de *G. clarum* e a aplicação foliar com GB aumentou ainda mais os teores desses nutrientes em plantas com déficit hídrico. Neste tratamento, foram observados os maiores teores de Fe ($P < 0,1$).

3.3. Alocação de N, P, K e Ca

A imposição do estresse hídrico alterou a alocação de N e Ca em plantas de *J. curcas* (Figura 3a e 4a). Quando as plantas foram inoculadas com *G. clarum*, a alocação de N para raízes foi significativamente superior, independente da deficiência hídrica ($P < 0,1$). Entretanto, quando a alocação de Ca foi analisada, verificou-se que a inoculação com *G. clarum* não foi suficiente para aumentar a alocação deste nutriente para folhas e raízes.

Micorriza arbuscular e GB alteraram positivamente a alocação de P para raízes das plantas (Figura 3b). Entretanto, em folhas de *J. curcas* estas condições fizeram com que menor quantidade de P fosse alocado para esta parte das plantas.

Quando as plantas de *J. curcas* foram submetidas ao estresse hídrico, a alocação de K para folhas foi afetada positivamente pela inoculação com *G. clarum*, sendo que tratamento com GB alterou a alocação de biomassa para raízes também quando estresse hídrico foi imposto, independente da inoculação com *G. clarum* (Figura 4b).

4. DISCUSSÃO

Colonização micorrízica foi maior nas plantas que não foram submetidas à condição de estresse hídrico (Figura 1), evidenciando a alta dependência micorrízica de *J. curcas* para alcançar melhor desenvolvimento, como observado por Carvalho [36], que verificou porcentagem de colonização micorrízica superior a 75% em condições de campo.

Plantas micorrizadas de *J. curcas* foram mais eficientes na utilização de nutrientes em condições de estresse hídrico do que plantas não micorrizadas e bem irrigadas (Tabela 2b). A simbiose micorrízica é um componente-chave que auxilia as plantas a lidar com condições ambientais adversas [4]. Compreender as respostas das plantas jovens é particularmente importante para a elucidação dos mecanismos de sensibilidade e tolerância ao déficit hídrico.

A aplicação de GB em plantas micorrizadas de *J. curcas* resultou em aumento da biomassa vegetal e maior alocação de biomassa radicular nas plantas sob déficit hídrico (Figura 2). Pequenas moléculas orgânicas, incluindo solutos orgânicos e inorgânicos podem proteger as plantas contra o déficit hídrico [23]. A aplicação destas moléculas em mudas de plantas micorrizadas resultou em aumento da biomassa vegetal nestas

plantas. Plantas de *J. curcas* sob déficit hídrico, tratadas com GB e inoculadas com FMAs apresentaram maior alocação de biomassa radicular que plantas sob estresse hídrico que não receberam estes tratamentos. Segundo Achten et al. [24], *J. curcas* faz um médio ou intermediário investimento em biomassa foliar, quando bem irrigadas, em comparação com outras árvores e arbustos tropicais e pode crescer no limiar do estresse hídrico (40 % de água disponível para planta) sem alterar a forma do caule e seu padrão de alocação de biomassa. Neste estudo, o padrão de alocação de biomassa para folhas foi alterado pela imposição do estresse hídrico e nem mesmo a inoculação com FMAs e a aplicação foliar de GB foi capaz de revertê-lo. Este comportamento não foi verificado quanto à alocação de biomassa para o caule, em que plantas sob estresse hídrico apresentaram maior alocação de biomassa para este local.

Os efeitos benéficos dos FMA em plantas sob estresse hídrico podem estar relacionados à maior absorção de água, nutrientes e da atividade fotossintética [25]. Plantas micorrizadas desenvolvem um sistema radicular mais vigoroso, o que a torna mais eficaz na absorção de nutrientes [26]. As plantas, então, convertem maior quantidade de fotossintatos para o desenvolvimento da raiz para aumentar a sua capacidade de absorção [27].

Os resultados sobre o uso de nutrientes indicam a alta eficiência do fungo *G. clarum* no uso destes nutrientes por plantas de *J. curcas*. Interessantemente, este efeito foi mais acentuado sob condições de estresse hídrico, onde a aquisição de nutrientes pelas plantas é mais limitada, o que evidencia a importância da presença do fungo nestas condições. Plantas micorrizadas de *J. curcas* mostraram-se mais eficientes na utilização de N, P, K, Ca, Mg e Fe em condições de estresse hídrico (Tabela 2b).

A contribuição de FMAs na acumulação de Mg e Fe em plantas é bastante controversa. Em bananeiras, por exemplo, foi verificado maior acúmulo de Mg em plantas inoculadas com *G. clarum* ou *Acaulospora scrobiculata* e em plantas controle

do que em plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* [39]. Aumento na absorção de Mg é relatado em plantas micropropagadas de *J. curcas* inoculadas com *G. clarum* [37] e em folhas de *Cherimoya* [38]. Com relação ao nutriente Fe, para a maioria das espécies de plantas associadas à FMAs já estudadas, a associação micorrízica arbuscular não têm desempenhado grandes efeitos para o aumento da absorção deste nutriente pelas plantas [40], provavelmente pela grande abundância desse nutriente nos solo de modo geral. Entretanto, algumas espécies de FMAs tem se mostrado mais eficientes em relação a outras, o que foi verificado por Miransari et al. [41], que estudando diferentes isolados de FMAs associados à plantas de milho, verificou que *Glomus etunicatum* (Irã) mas não *Glomus mosseae* (Canadá) aumentou a absorção deste nutriente pelas plantas.

Em condições de estresse hídrico, a inoculação com *G. clarum* aumentou o conteúdo de P em comparação com as plantas bem irrigadas (Tabela 2). Plantas não micorrizadas sob estresse hídrico apresentaram menor conteúdo de P quando comparadas a plantas colonizadas por *G. clarum* sob déficit hídrico. Esses resultados se contrapõem às informações relatadas por diferentes trabalhos realizados em plantas de citros [23]. Além disso, Subramanian et al. [28] observaram que plantas de tomateiro micorrizadas apresentaram conteúdo de P maior tanto na raiz quanto na parte aérea das plantas, independentemente da intensidade do estresse hídrico.

A disponibilidade e a concentração de P pode afetar o equilíbrio de água no hospedeiro. Por exemplo, condutância estomática pode ser influenciada por deficiência de P. Koide [29] sugeriu que o aumento da condutância estomática e da taxa de transpiração em plantas micorrizadas pode ser devido à melhoria na capacidade fotossintética mediada por P.

Aumento na absorção de K em plantas de *J. curcas* colonizadas por *G. clarum*, pode indicar que este íon está envolvido nos mecanismos de tolerância dessas plantas em condições de déficit hídrico (Figura 4b). Quando a água no solo é limitada, as

plantas sofrem perda de turgor e murchamento - sintomas típicos de deficiência de K [30]. Acumulando-se no vacúolo, K desempenha papel importante, por ajudar a manter um nível elevado de água nos tecidos. O acúmulo de K verificado nos tecidos de plantas micorrizadas sob estresse hídrico, neste estudo, pode ter contribuído para a redução do potencial osmótico e aumento da pressão de turgescência.

Em plantas superiores, K afeta a fotossíntese em vários níveis. O papel do K na fixação de CO₂ foi demonstrado, e um aumento no teor de K nas folhas é acompanhado por aumento nas taxas de fotorrespiração e fotossíntese [31, 32]. O potássio é um dos mais importantes solutos inorgânicos, e tem papel importante em processos como extensão celular, transporte de solutos no xilema e balanço de água [30, 4]. Extensão celular é, entre outros fatores, uma consequência do acúmulo de K. Nas células vegetais, potássio é necessária não só para a estabilização do pH no citoplasma, mas também para aumentar o potencial osmótico no vacúolo [30].

Plantas micorrizadas de *J. curcas* que receberam aplicação foliar de GB foram mais eficientes no uso de N sob condições de estresse hídrico (Tabela 2b). Devido à grande demanda de N pelas plantas e ao déficit hídrico impedir a mobilidade de íons NO₃ do solo para a planta, a colonização micorrízica é importante para o status nutricional de N da planta hospedeira em tais condições. O efeito direto dos FMAs na aquisição de N por plantas crescendo em solos sob condições de déficit hídrico tem sido observado [33]. Subramanian e Charest [34] relataram que o micélio externo tem a capacidade de transporte de 40% do N sob condições de seca moderada, o que modifica a aquisição de N e assimilação pelas raízes da planta hospedeira. Azcón- Aguilar et al. [35] relataram que as plantas micorrizadas tem maior acesso às formas de N que não estão disponíveis para plantas não micorrizadas, o que auxilia na manutenção do status nutricional da planta hospedeira em condições de déficit hídrico. Neste estudo, plantas micorrizadas de

J. curcas que receberam aplicação foliar de GB mostraram-se mais eficientes na utilização de N sob condições de estresse hídrico.

5. CONCLUSÕES

Sob condições de déficit hídrico, a colonização de J. curcas por G. clarum aumenta a absorção de nutrientes essenciais pelas plantas, alterando a distribuição de biomassa e nutrientes, características estas que aumentam a robustez desta planta às condições de estresse hídrico, uma vez que o baixo índice pluviométrico é uma condição limitante da produção de sementes.

G. clarum e GB aumentam a absorção de nutrientes em condições de déficit hídrico, devendo desempenhar um papel importante na tolerância ao estresse e produção de biomassa em J. curcas.

6. REFERÊNCIAS

- [1] International culture collection of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi – INVAN <http://invam.caf.wvu.edu> (2012).
- [2] Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis, 3rd ed. Academic Press, London, 2008.
- [3] Kumar A, Sharma S, Mishra S. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. J Plant Growth Regul 2010; 29:297–306.
- [4] Porras-Soriano A, Soriano-Martín ML, Porras-Piedra A, Azcón R. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. J Plant Physiol 2009; 166: 1350-1359.

- [5] Asrar AWA, Elhindi KM. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J Biol Sci* 2011; 18: 93–98.
- [6] Maggio A, Reddy MP, Joly RJ. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *J Exp Bot* 2000; 44: 31–38.
- [7] Porcel R, Ruiz-Lozano JM. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot* 2004; 55: 1743–1750.
- [8] Treberg JR, Driedzic WR. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 2007; 147: 475–83.
- [9] Oishi H, Ebina M. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* 2005; 162: 1077–1086.
- [10] Wu WQ, Su XY, Xia Y, Wang YS, Luan LJ. An, The Suaeda liaotungensis kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica* 2008; 159: 17–25.
- [11] Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, An LJ. An, Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from Suaeda liaotungensis and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 1431–1436.
- [12] Ma QQ, Wang W, Li YH, Li DQ, Zou Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *J Plant Physiol* 2006; 163: 165–175.
- [13] Naidu BP, Cameron DF, Konduri SV. Improving stress tolerance and productivity of plants by a biochemical approach in agronomy and plant breeding. *Proceedings of the IX Australian Agronomy Conference Wagga, Australia (1998)*, pp. 355–358.
- [14] Saturnino HM, Pacheco DD, Kakida J, Tominaga N, Gonçalves NP. Cultura do Pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) *Inf Agropecu* 2005; 26: 44–78. [In Portuguese]

- [15] Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Laxmipathi GCL. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Appl Energy* 2010; 87: 732–742.
- [16] Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular.arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 1988; 108: 211. 218.
- [17] Clark RB. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 1975; 23: 458-460.
- [18] Braga JM, Defelipo BV. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. *Revista Ceres* 1974; 21: 73-85. [In Portuguese]
- [19] Malavolta E. ABC da análise de solos e folhas. São Paulo: Ceres, 1992. 124 p. [In Portuguese]
- [20] Koske R, Gemma JN. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol Res* 1989; 92: 486 – 505.
- [21] Giovannetti M, Mosse B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 1980; 84: 489–500.
- [22] Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. Growth response of several plants species to mycorrhiza in soil of moderate P fertility: mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 1983; 70: 191–209.
- [23] Wu QS, Xia RX. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *J Plant Physiol* 2006; 163: 417-425.
- [24] Achten WMJ, Maes WH, Reubens B, Mathijs E, Singh VP, Verchot L, Muys B. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *Biomass Bioenergy* 2010; 34: 667-676.
- [25] Al-Karaki GN. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequeunte performance under irrigation with saline water. *Sci Hortic* 2006; 109: 1-7.
- [26] Schellenbaum L, Berta G, Ravolanirina F, Tisserant B, Gianinazzi S, Fitter AH. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Ann bot* 1991; 68: 135–141.

- [27] Wang GB, Cao FL. Effects of soil salt and water contents on growth and biomass allocation of *Taxodium distichum*. *J Appl Ecol* 2004; 15:2396–2400.
- [28] Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Sci Hortic* 2006; 107: 245–253.
- [29] Koide RT. Mycorrhizal symbiosis and plant reproduction. In: Kapulnik, Y., Douds, D.D. (Eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. pp. 19–46.
- [30] Bottrill DE, Possingham JV, Kriedemann PE. The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant Soil* 1970; 32: 424–38.
- [31] Reddy KR, Zhao D. Interactive effects of elevated CO₂ and potassium deficiency on photosynthesis, growth, and biomass partitioning of cotton. *Field Crops Res* 2005; 94: 201–213.
- [32] Qu C, Liu C, Gong X, Li C, Hong M, Wang L, Hong F. Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. *Environ Exp Bot* 2012; 75:134– 141.
- [33] Tobar RM, Azcón R, Barea JM. The improvement of plant N acquisition from an ammonium-treated, drought-stressed soil by the fungal symbiont in arbuscular mycorrhizae. *Mycorrhiza* 1994; 4: 105–108.
- [34] Subramanian KS, Chares TC. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza* 1999; 9: 69-75.
- [35] Azcón-Aguilar C, Alba C, Montill AM, Barea JM. Isotopic (¹⁵N) evidence of the use of less available N forms by VA mycorrhizas. *Symbiosis* 1993; 15: 39-48.
- [36] Carvalho AMX. Fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (in Portuguese) 2008.
- [37] Folli-Pereira MS, Meira-Haddad LS, Rasool N, Otoni WC, Kasuya MCM. Development of mycorrhized vitroplants of *Jatropha curcas* L. at different rooting stages. *Plant Biotechnol Rep* 2012. DOI 10.1007/s11816-012-0232-5

- [38] Padilla IMG, Encina CL. Changes in root morphology accompanying mycorrhizal alleviation of phosphorus deficiency in micropropagated *Annona cherimola* Mill. plants. *Sci Hortic* 2005; 106: 360-369.
- [39] Yano-Melo AM, Saggin-Junior OJ, Lima-Filho JM, Melo NF, Maia LC. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza* 1999; 9:119-123.
- [40] Miransari M, Bahrami HA, Rejali F, Malakouti MJ. Effects of arbuscular mycorrhiza, soil sterilization, and soil compaction on wheat (*Triticum aestivum* L.) nutrients uptake. *Soil & Tillage Research* 2009; 104: 48-55.
- [41] Miransari M, Bahrami HA, Rejali F, Malakouti MJ. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil & Tillage Research* 2009; 103: 282-290.

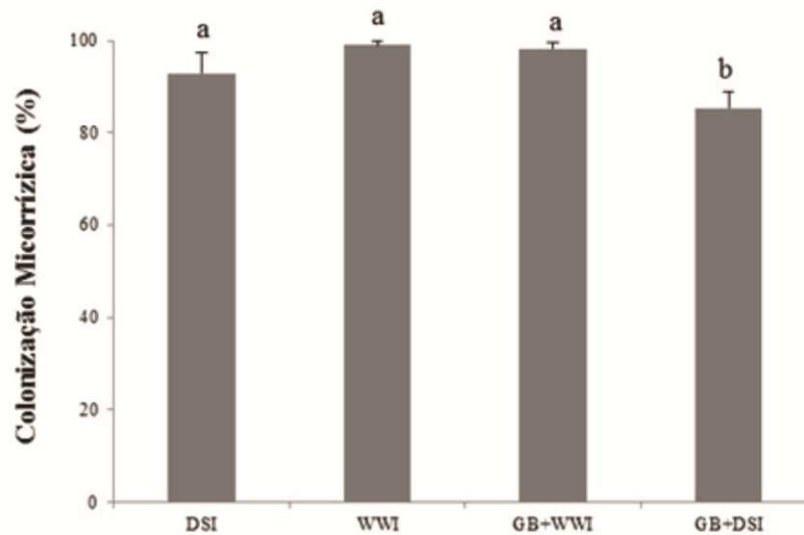


Figura 1. Porcentagem de raízes de plantas de *Jatropha curcas* colonizadas por *Glomus clarum* sob diferentes condições hídricas (suspensão da rega - DS e bem irrigadas - WW), inoculadas com *G. clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos, não diferem entre si a 5 % de probabilidade pelo teste de Duncan. As barras representam o desvio padrão.

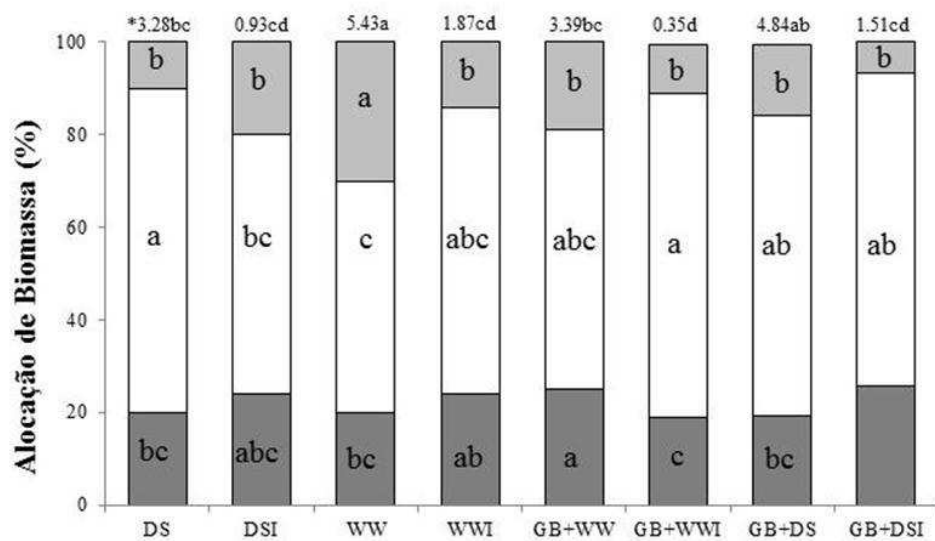


Figura 2. Alocação de biomassa para folha (ABF - ■), caule (ABC -□) e raiz (ABR - ■) e *biomassa total (g planta⁻¹) em plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (suspensão de rega - DS e bem irrigadas - WW), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

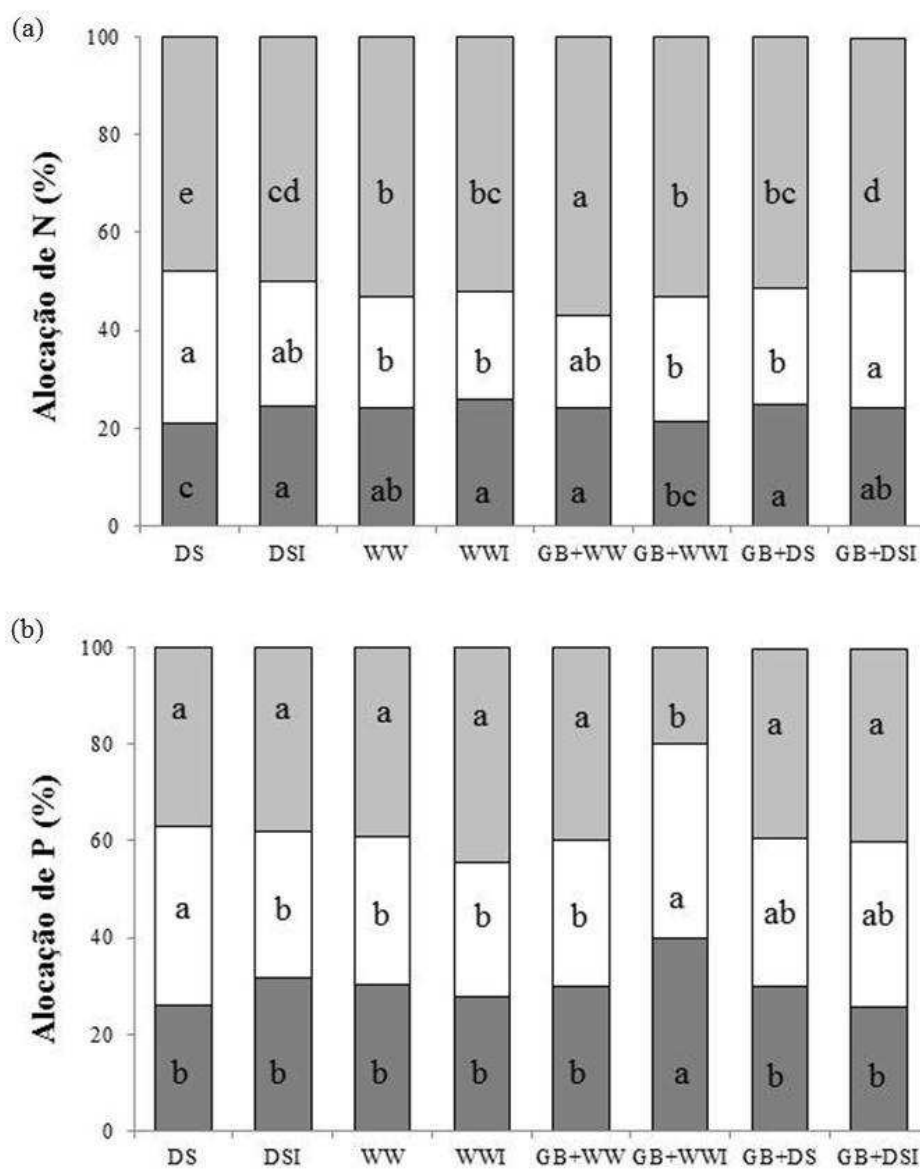


Figura 3. Alocação de N (a) e P (b) para folha (APF - ■), caule (APC - □) e raiz (APR - ▨) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos, não diferem entre si a 10% de probabilidade pelo teste de Duncan.

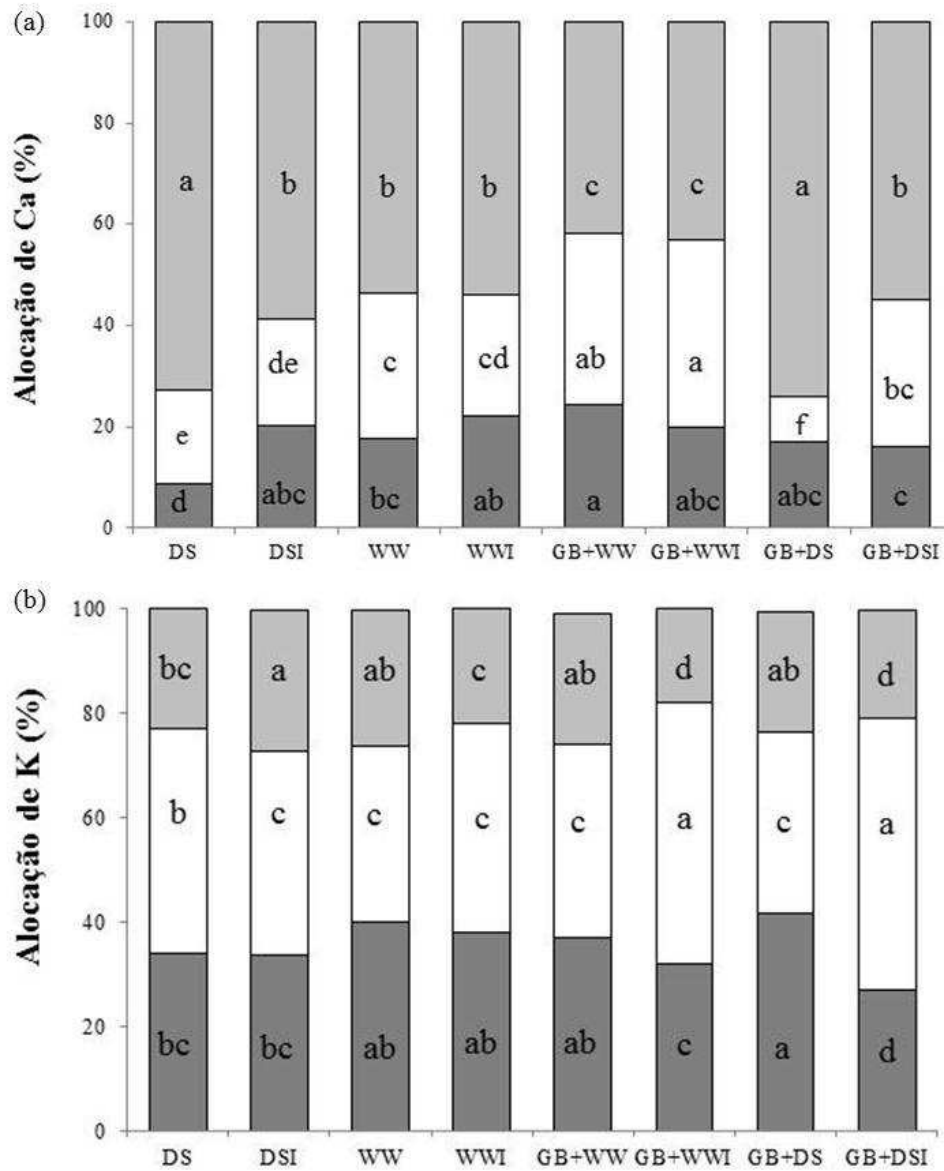


Figura 4. Alocação de Ca (a) e K (b) para folha (APF - ■), caule (APC -□) e raiz (APR - ■) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos, não diferem entre si a 10 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos hídricos aplicados em plantas de *J. curcas* após a inoculação das plantas com o FMA *G. clarum*.

Tratamento	Descrição
WW	Plantas bem irrigadas
WWI	Plantas inoculadas com <i>G. clarum</i> e bem irrigadas
DS	Plantas submetidas ao déficit hídrico
DSI	Plantas inoculadas com <i>G. clarum</i> e submetidas ao déficit hídrico
GB + WW	Plantas bem irrigadas e tratadas com Glicina betaína (GB)
GB + WWI	Plantas bem irrigadas e inoculadas com <i>G. clarum</i> e tratadas com GB
GB + DS	Plantas tratadas com GB e submetidas ao déficit hídrico
GB + DSI	Plantas inoculadas com <i>G. clarum</i> e tratadas com GB, submetidas ao déficit hídrico

Tabela 2. Teores de N, P, K, Ca, Mg e Fe (A) e eficiência de utilização de nutrientes (%) (B) em plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas (I) ou não com *Glomus clarum* e tratadas com glicina betaína (GB).

Tratamento*	N	P	K	Ca	Mg	Fe
A(dag/Kg)					(mg/Kg)
DS	4,02b	0,25b	4,57a	1,30bc	1,03b	578,75c
DSI	3,74c	0,31a	4,04ab	0,97c	0,76cd	827,00c
WW	3,49cde	0,25b	4,20ab	1,31bc	0,71cd	1484,00ab
WWI	3,38de	0,27b	3,80b	1,29bc	0,72cd	622,50c
GB+WW	4,31a	0,26b	4,24ab	1,15bc	0,82c	1237,50b
GB+WWI	3,63cd	0,21c	2,99c	1,19bc	0,58d	1522,75ab
GB+DS	3,24e	0,22bc	4,20ab	1,55ab	1,26a	1457,25ab
GB+DSI	3,44de	0,31a	4,64a	1,89a	1,16ab	1860,00a
B (%)					
DS	0,60c	8,20b	0,53c	1,86bcd	2,22b	31,76bc
DSI	1,34a	15,93a	1,16a	5,86a	6,09a	57,80a
WW	0,11d	1,37c	0,09d	0,42d	0,45c	3,71e
WWI	1,03b	14,99a	0,84b	3,26b	4,56a	49,76ab
GB+WW	0,34cd	5,09bc	0,34cd	1,58cd	1,53bc	18,20cde
GB+WWI	0,96b	16,84a	1,08ab	3,04bc	5,41a	11,24de
GB+DS	0,43c	6,07b	0,35cd	1,04d	1,34bc	25,95cd
GB+DSI	1,35a	17,41a	1,06ab	2,82bc	4,67a	32,15bc

* Médias seguidas de letras iguais entre os tratamentos, não diferem entre si a 10 % de probabilidade pelo teste de Duncan.

CAPÍTULO III

GLICINA BETAÍNA E MICORRIZA ARBUSCULAR ALTERAM A FOTOSSÍNTESE E A EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM PLANTAS DE *Jatropha curcas* SOB ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO

O investimento maciço em novas plantações de pinhão-mansão em todo o mundo não é suficientemente baseado em conhecimento científico sobre a sua fisiologia. Por esta razão plantações de pinhão-mansão localizadas em regiões áridas e semi-áridas têm mostrado que a produtividade nestas áreas está muito abaixo de seu potencial e, evidências indiretas sugerem o déficit hídrico como principal fator limitante. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da associação micorrízica arbuscular e da aplicação foliar de glicina betaína (GB) em plantas de *Jatropha curcas*, submetidas ao estresse hídrico. Plantas de *J. curcas* foram inoculadas ou não com esporos de *Glomus clarum* e após 60 dias da inoculação, parte das plantas recebeu aplicação foliar de GB durante quatro dias. Após tratamento com GB, parte das plantas foi submetida ao estresse hídrico pela suspensão da irrigação. *G. clarum* e GB modificaram as respostas das plantas ao déficit hídrico. Plantas inoculadas com *G. clarum* exibiram maior eficiência no uso da água quando submetidas ao estresse hídrico, diferente de plantas tratadas com GB que apesar de apresentarem potencial hídrico foliar mais negativo, não foram tão eficientes no uso da água. Plantas tratadas com GB e *G. clarum* durante déficit hídrico exibiram ajustamentos significativos na captação e dissipação da luz e alta concentração de clorofila. Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que *G. clarum* e GB podem ser utilizados como fator de atenuação das consequências do estresse hídrico em plantas de *J. curcas*.

Palavras-chave: FMA, *Glomus clarum*, Déficit hídrico, Biodiesel, Fotossíntese.

1. INTRODUÇÃO

A crescente expectativa em torno de culturas que representem potenciais fontes de matéria prima para a produção de óleo com fins energéticos tem resultado na demanda de informações acerca de espécies oleaginosas como *Jatropha curcas*. Essa espécie cresce nas mais diversas áreas, mas pode ter a produtividade comprometida, em regiões áridas e semi-áridas (Maes et al., 2009).

Por razões, tanto técnica como econômica, o potencial de produção de *J. curcas* está longe de ser alcançado. Além das restrições agronômicas, socioeconômicas e institucionais, as colheitas previstas por programas de melhoramento estão falhando globalmente (Divakaraet al., 2009). Programas anteriores de pesquisa, lançados no Brasil, Nicarágua e na Índia, envolvendo plantações em grande escala, indicaram que a produtividade das culturas é muito baixa para ser comercializada e, em casos extremos, as plantações não conseguiram produzir os frutos (Divakaraet al., 2009).

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são fungos de solo formadores da relação mutualista mais comum na natureza, as micorrizas arbusculares, formadas entre esses e as raízes de aproximadamente 80% das plantas terrestres, com origem presumida há aproximadamente 460 milhões de anos atrás (INVAM, 2012). Os FMAs podem afetar o crescimento e a produtividade da planta hospedeira sob condições de alta e baixa umidade do solo (Augé, 2001), aumentando as respostas da planta ao déficit hídrico por vários mecanismos, destacando-se: aumento da absorção de água a partir do solo pelas hifas (Augé et al., 2003); alteração dos níveis hormonais, causando mudanças na condutância estomática (Augé et al., 2008); aumento da turgescência foliar e redução do potencial osmótico (Wu e Xia, 2006); e melhoria da nutrição da planta hospedeira

(Chen et al., 2005). Em muitas regiões áridas e semi-áridas o estresse hídrico tem limitado a produtividade das culturas (Maggio et al., 2000). Nestas condições, o potencial hídrico foliar é, normalmente, maior em plantas micorrizadas do que em plantas não micorrizadas (Porcel e Ruiz-Lozano, 2004). No entanto, os mecanismos pelos quais os FMAs melhoram a tolerância à seca e o fluxo de água nas plantas hospedeiras continua obscuro.

Glicina betaína (GB) atua como um osmólito protetor não tóxico durante períodos de déficit hídrico em muitos organismos, incluindo algas, bactérias, plantas superiores e animais (Treberg e Driedzic, 2007). É sintetizada em elevadas concentrações em muitas espécies de plantas em resposta aos vários tipos de estresses ambientais, atuando não apenas como um osmoprotetor, mas também na estabilidade de membranas e proteínas (Hamilton e Heckathorn, 2001; Oishi e Ebina, 2005). Esse composto parece ser um determinante crítico da tolerância ao estresse. Seu acúmulo é induzido sob condições de estresse sendo correlacionado com o nível de tolerância da planta (Moghaieb et al., 2004; Wu et al., 2008). GB tem sido apontada como responsável pela tolerância de plantas ao estresse hídrico via preservação do equilíbrio osmótico e estabilizando estruturas quaternárias de proteínas complexas, membranas e muitas unidades funcionais como complexo de evolução de O₂ do PSII (Allakhverdiev et al., 2003; Hinch, 2006). A função protetora de GB parece não depender apenas de sua capacidade osmoprotetora, mas também de efeitos fisiológicos e físico-químicos específicos na resposta das plantas ao estresse (Demiral e Türkan, 2006). Pesquisas relacionadas à função de GB na tolerância à seca envolvem mecanismos bioquímicos que podem ser estudados de duas formas: pela aplicação de GB (Ma et al., 2006) e pela produção de plantas melhoradas geneticamente (Zhou et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da associação micorrízica arbuscular e da aplicação foliar de GB na atividade fotossintética e na eficiência do uso da água em plantas de *J. curcas*, submetidas à estresse hídrico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Inóculo fúngico e cultura monoaxênica

Utilizou-se esporos de FMA, *Glomus clarum*, mantidos e meio M, pH 5,5 com 0,4 % de Fitagel (Bécard e Fortin, 1988), pertencente à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas/BIOAGRO/UFV.

2.2. Material vegetal, condições de crescimento e estratégia experimental.

Sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foram lavadas em água destilada esterilizada e desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 % (v/v) por 15 min, seguidas de lavagem água destilada esterilizada e a remoção do tegumento. Após a retirada do tegumento, as mesmas foram imersas em solução de NaOCl 4 % (v/v) por 15 min, seguidas de três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia esterilizada, e mantidas em casa de vegetação, sendo irrigadas diariamente. Quinze dias após a germinação, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos contendo substrato constituído de uma mistura de solo e areia (1:1, v/v) e inoculado com cubos de meio de cultura contendo hifas, raízes de cenoura transformada e 100 esporos do FMA *G. clarum*. No controle, as plantas foram transplantadas para vasos contendo cubos de meio de cultura com raízes de cenoura transformada sem FMA. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob luz natural, as

plantas regadas diariamente e, quando necessário, aplicada solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), com ½ da força para P.

Após 60 dias da inoculação com *G. clarum*, as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos hídricos (Tabela 1).

O tratamento com GB foi realizado pulverizando as folhas das plantas com solução aquosa de GB a 100 mM em Tween 20 a 1%, duas vezes por dia, durante quatro dias. As plantas controle foram pulverizadas solução aquosa de Tween 20 a 1%. Após este período, as plantas foram submetidas a déficit hídrico induzido pela suspensão da irrigação por dois dias, quando foram feitas as avaliações.

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial, com seis repetições.

2.3. Medições fotossintéticas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), condutância estomática de vapor de água (gs), concentrações interna de CO₂ (C_i) e a taxa de transpiração instantânea (E) foram medidas em um sistema aberto, utilizando um analisador de gases infravermelho (Li 6400 XT, Li-Cor, Lincoln, EUA). Medições foram feitas entre 07:00 e 10:00 hs, à temperatura ambiente e pressão parcial de CO₂ 40Pa, sob radiação fotossinteticamente ativa (PAR) equivalente à do ambiente (1000 μmol m⁻² s⁻¹). Dois métodos para estimar a eficiência de uso de água (EUA) foram usados para a análise dos dados e interpretação: (1) EUA instantânea, calculado pela razão entre A e E; (2) EUA intrínseca, calculada pela razão entre A e gs.

Após serem adaptados ao escuro, por 30 min, os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante (0,03 μmol m⁻² s⁻¹) para a determinação da fluorescência inicial (F₀). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 μmol (fótons) m⁻²s⁻¹ e duração de 0,8 s, foi aplicado para estimar-se

a fluorescência máxima emitida (F_m), a partir da qual a razão fluorescência máxima-variável da clorofila, $F_v/F_m = [(F_m - F_0)/F_m]$, foi calculada.

O tecido foliar foi exposto a PAR actínica ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 60 s para se obter o rendimento da fluorescência de estado estacionário (F_s). Em seguida, um pulso de luz saturante branco ($6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 1 s) foi aplicado para alcançar a fluorescência máxima adaptada à luz (F_m'). A fluorescência adaptada à luz inicial (F_0') foi estimada de acordo com Oxborough e Baker (1997). Com esses parâmetros, estimou-se o rendimento quântico fotoquímico do transporte de elétrons através de fotossistema II (FSII) [$\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F_s') / F_m'$], conforme Genty et al. (1989).

Para calcular-se a taxa de transporte de elétrons (TTE), considerou-se que tanto o FSII como o FSI absorvem quantidades iguais de luz; para a estimativa de RFA absorvida, a absorvância foliar foi calculada a partir da concentração de clorofila por unidade de área (Evans, 1993). A TTE foi estimada como: $\text{TTE} = (\text{RFA interceptada pela folha}) \times (\text{absorvância foliar}) \times \Phi_{\text{FSII}} \times 0,5$. Foram estimados, ainda, o coeficiente de extinção não-fotoquímica [$\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$] e a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII [$F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$] (Krause e Weis, 1991).

Clorofila total (Chl) e carotenóides totais (Car) foram extraídos em acetona 80% (v/v) e quantificados de acordo com Lichtenthaler (1987).

2.4. Análise de crescimento e potencial hídrico

Após o período de aplicação dos tratamentos as folhas foram separadas do caule e do sistema radicular. Para a determinação da massa fresca as folhas, caule e sistema radicular foram coletados e pesados. Posteriormente foram colocadas em estufa de ventilação forçada, a 70°C até massa constante para determinação da massa seca.

A densidade de tecido foliar (LTD) foi calculada pela equação: $LTD = DW/FW$; $g\ Kg^{-1}$, em que DW é massa seca e FW, massa fresca das folhas.

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi determinado em folhas individuais, com uma bomba de pressão do tipo Sholander, na antemanhã (04:00-05:30 h).

2.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas utilizando o software SAEG versão 9.1 (SAEG, 2007).

3. RESULTADOS

Das análises fotossintéticas realizadas, apenas Chl b não foi alterada pelos tratamentos (Figura 2c). Algumas características responderam significativamente à aplicação foliar de GB e a manutenção no suprimento de água e minimamente à inoculação micorrízica (Figuras 1a, 2b, 4a e 4c), enquanto outras foram mais responsivas à inoculação com FMA (Figura 4b, 5b, 6a e 6b). Entretanto, de uma maneira geral, as plantas submetidas ao déficit hídrico responderam melhor à aplicação foliar de GB do que à inoculação com FMA.

A imposição do estresse hídrico e inoculação com *G. clarum* afetaram negativamente a produção de biomassa pelas plantas (Figura 1a), enquanto a aplicação foliar de GB colaborou para que as plantas submetidas ao déficit hídrico apresentassem menor potencial hídrico foliar (Figura 1b). Esta resposta também foi observada em plantas tratadas com GB e micorrizadas não submetidas ao déficit hídrico (Figura 1c).

Altos valores de ETR, NPQ e F_v'/F_m' foram observados em plantas micorrizadas submetidas ao déficit hídrico (Figura 4c, 5a e 5c). Entretanto, reduções nestas características em plantas de *J. curcas* tratadas com GB e micorrizadas foram observadas em plantas bem irrigadas. Em plantas micorrizadas tratadas com GB e não submetidas ao estresse hídrico, aumento nos valores de F_0 foram acompanhados por decréscimos nos valores de F_vF_m (Figura 4a e 4c).

Plantas submetidas ao estresse hídrico e micorrizadas também apresentaram maiores valores de F_v'/F_m' e Φ_{PSII} em relação àquelas submetidas déficit hídrico não micorrizadas (Figura 4c, 5b).

Plantas sob déficit hídrico tratadas com GB apresentaram reduções em A e g_s em relação às plantas WW e WWI (Figura 3a e 3b). Entretanto, estas reduções foram acompanhadas por aumentos em C_i , ETR e F_vF_m com nenhuma mudança em E (Figura

3c, 5c e 4b). Em plantas de *J. curcas*, independente do tratamento aplicado, maior parte da energia absorvida pelas moléculas de clorofila a foram liberadas na forma de calor envolvendo NPQ (Figura 5a).

Plantas inoculadas com *G. clarum* exibiram maior eficiência no uso da água, mesmo aquelas submetidas ao estresse hídrico (Figura 6). Apesar de apresentarem menor potencial hídrico foliar e, portanto, menor ajustamento osmótico. As plantas tratadas com GB não foram tão eficientes quanto ao uso da água.

A disponibilidade de água alterou os teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 2). Em geral, plantas micorrizadas submetidas ao déficit hídrico apresentaram menores concentrações de Car e Chl (a+b). A aplicação foliar de GB alterou os teores foliares de Chl a em plantas submetidas ao estresse hídrico. Plantas bem irrigadas, tratadas com GB e inoculadas com FMA apresentaram maior razão Chl a/b.

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a inoculação com *G. clarum* foi eficaz na manutenção do balanço hídrico da planta, através do ajuste osmótico, do que o tratamento com GB em plantas de *J. curcas* em condições de déficit hídrico (Figura 1b). Aumento em F_0 foi acompanhado por redução no valor de F_v/F_m quando as plantas foram tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum*, sem que fossem submetidas ao déficit hídrico (Figura 4a e 4b), indicando dano ao aparato fotossintético e que as plantas sob estas condições se encontravam, de fato, estressadas. GB é conhecida como um osmólito eficiente no ajustamento osmótico e manutenção do potencial hídrico nas células das plantas (Agbomaet al., 1997). O ajustamento osmótico consiste no acúmulo de pequenas moléculas incluindo solutos orgânicos e íons inorgânicos, sendo um

importante mecanismo de tolerância à seca em muitas plantas (Martinez-Ballesta et al., 2004).

Maior potencial hídrico foliar encontrado em plantas micorrizadas em relação às plantas tratadas com GB (Figura 1b) pode ser explicado pelo efeito dissipador do FMA, que exige açúcares solúveis das folhas (Porcel e Ruiz-Lozano, 2004) que potencialmente poderiam ser utilizados para o ajustamento osmótico durante o déficit hídrico.

A aplicação foliar de GB aumentou a biomassa vegetal total em plantas de pinhão manso sob estresse hídrico (Figura 1a), resultante de menor potencial hídrico foliar (Figura 1b), e maior ajustamento osmótico em resposta ao tratamento com GB, permitindo que as mudas acumulassem mais hidratos de carbono e aumentassem a biomassa vegetal, assim como em plantas de oliveira (Denaxa et al., 2012).

Plantas tratadas com GB e sob estresse hídrico, reduziram a A e g_s , sem mudanças em F_vF_m e ETR, com significativo aumento em C_i , resultados também observados na literatura (Rousseaux et al., 2007; Roussos et al., 2010; Denaxa et al., 2012), sugerindo limitação da fotossíntese por fatores estomáticos e bioquímicos (Boughalleb e Hajlaoui, 2010).

O alto valor de C_i em plantas tratadas com GB pode ser conectado diretamente com limitações estomáticas, por restrições na difusão de CO_2 e, ou limitações de eficiência de carboxilação (Medrano et al., 2002). De acordo com Rouhi et al. (2007) reduções em A e g_s e altos valores de C_i em plantas com déficit hídrico, indicam diminuição da eficiência de carboxilação. Eles sugeriram que os efeitos não estomático são geralmente mais importantes durante eventos de déficit hídrico mais prolongado e severo (Rouhiet al., 2007), pois a condutância no mesófilo é fortemente influenciada pelo déficit hídrico, temperatura da folha e irradiação (De Lucia et al., 2003). Alta densidade de tecido foliar é outro fator limitante importante das taxas de difusão de CO_2 intercelular da cavidade

subestomática para locais de carboxilação, devido à estrutura mais densa de células de mesofilo (Chartzoulakis et al., 1999). Isto foi confirmado pela alta densidade do tecido foliar (Figura 1c) apresentada pelas plantas de *J. curcas*.

É reconhecido que os estômatos respondem a variações na disponibilidade hídrica do solo (Lawlor e Cornic, 2002). Eles desempenham papel fundamental na manutenção do balanço hídrico das plantas: as reservas de água nas folhas e caules são muito pequenas quando comparadas com a quantidade de água perdida por transpiração. Assim, as plantas poderiam ser rapidamente desidratadas se não houvesse rápidos mecanismos de resposta, como fechamento estomático (Slatyer, 1967). Fechamento estomático é mais comumente observado ao meio dia, quando há declínio da condutância estomática devido à diminuição do potencial hídrico foliar. Isto pode resultar em limitação da atividade fotossintética através da redução de C_i . Tais respostas, em curto prazo são, em teoria, essenciais para conservação do balanço hídrico das plantas.

Há evidências de que o estresse hídrico altera o metabolismo do mesofilo (Flexas et al., 2008) associado com o endurecimento das paredes das células e ao aumento da lignificação da parede celular em resposta a sinais hidráulicos (Chazen e Neumann, 1994).

O aumento da transpiração (E), no tratamento com GB e micorriza arbuscular durante o estresse hídrico, é indicativo de maior intensidade de perda de água e menor eficiência de uso da água nessas condições (Figura 3d). Contudo, em algumas situações a menor eficiência de uso da água pode estar relacionada à maior capacidade de fixação de CO_2 pela planta, pois, enquanto os estômatos estão abertos e a água é perdida por transpiração, o CO_2 entra na folha e pode ser incorporado para formar carboidratos (Brodribb e Holbrook, 2003). A maior intensidade transpiratória pode não indicar, necessariamente, menor eficiência no uso da água nestas condições. A maior perda de

água por transpiração pode decorrer da maior necessidade dessa planta de incorporar CO₂, em função da alta atividade fotossintética que ela pode apresentar (Brodribb e Holbrook, 2003).

Embora plantas de *J. curcas* tratadas com GB tenham apresentando menor potencial hídrico foliar, elas foram muito pouco eficientes quanto ao uso da água quando submetidas ao estresse hídrico (Figuras 6a e 6b). A hipótese de que limitações bioquímicas são suficientes para modelar com precisão os fluxos de CO₂ e água (sem quaisquer limitações de condutância) tem sido confirmada (Keenan et al., 2009).

Limitações de condutância estomática podem superestimar o uso eficiente da água e, portanto, simular efetivamente o fluxo de água durante períodos de estresse hídrico (Keenan et al., 2009). Entretanto, estas limitações tornam-se eficazes na simulação de fluxos de água e CO₂ somente quando combinadas com limitações de condutância no mesófilo e vice-versa, sugerindo uma estreita relação entre as duas (Flexas et al., 2008). Isto sugere uma possível função comum na regulação da fotossíntese durante os períodos de estresse hídrico (Grassi e Magnani, 2005).

Plantas micorrizadas e não micorrizadas geralmente exibem respostas fotossintéticas diferentes. Plantas de *J. curcas* tratadas com GB, inoculadas com *G. clarum* e submetidas ao déficit hídrico exibiram ajustamentos significativos na captação e dissipação da luz, em contraste com plantas DS (Figura 5a, 5b e 2d). Estes ajustes incluem ainda o decréscimo nas concentrações de Chl (Krause, 1988); decréscimo no Φ PSII; concordante aumento do NPQ (Rodríguez-Calcerrada et al. 2008), o que pode estar associado a grandes pools de zeaxantina e ao alto estado de de-epoxidação do ciclo da xantofila, tal como ocorre em café (Matos et al., 2009). Além disso, Fv/Fm permaneceu em níveis elevados, independentemente da disponibilidade hídrica, da GB e da micorriza arbuscular (Figura 4b). Coletivamente, estas informações sugerem que *J. curcas* possui mecanismos de foto-proteção bem desenvolvidos para evitar a

fotoinibição e que o tratamento com GB e o estabelecimento da associação micorrízica arbuscular aumentam, ainda mais, a eficiência dos mecanismos fotoprotetores durante o estresse hídrico.

Concentração de Chl a, expressa em massa fresca de folhas, não foi alterada pelos tratamentos aplicados, com exceção das plantas tratadas com GB e bem irrigadas, com menor concentração deste pigmento. Entretanto, aumento na concentração deste pigmento foi verificado em algumas espécies sob déficit hídrico (Teixeira e Pereira, 2007). Houve redução da concentração de Chl (a+b) no tratamento combinado de GB e *G. clarum*, sob estresse hídrico (Figura 2d). Neste caso, aplicação foliar de GB foi eficiente para maior acúmulo de clorofila e carotenóides somente quando as plantas não haviam sido previamente inoculadas com *G. clarum* e estavam sob estresse hídrico (Figura 2b e 2d). Nos demais casos, GB reduziu as concentrações destes pigmentos e inoculação com *G. clarum*, por si só, não foi suficiente para manter altos teores de Chl (a+b) e Car em plantas sob déficit hídrico. Assim como ocorreu neste estudo, plantas micorrizadas de *Citrus tangerine* também acumularam menos clorofila quando submetidas à seca (Wu e Xia, 2006).

Diferentes espécies de FMAs variam na sua eficácia em favorecer aumento no teor de pigmentos fotossintéticos e algumas espécies de *Glomus* podem ser menos eficientes dependendo da espécie de planta em que se associam (Mathur e Vyas, 1995). Provavelmente, no presente estudo, sob déficit hídrico, *G. clarum* não foi eficiente em aumentar o conteúdo de clorofila e carotenóides em plantas de *J. curcas*.

5. CONCLUSÕES

A capacidade de plantas de *J. curcas* modificar suas características morfológicas, fisiológicas e estruturais em resposta à seca é alterada pela inoculação com FMAs e pelo

tratamento com GB. Na maioria dos casos, os efeitos de G. clarum e GB em plantas sob estresse hídrico são independentes. Aplicação foliar de GB é eficiente na manutenção do potencial hídrico foliar nas plantas submetidas ao déficit hídrico, em contrapartida, causa reduções significativas em grande parte das características fotossintéticas. Apesar de exibirem significativa redução do potencial hídrico foliar, como consequência do ajustamento osmótico, e maior produção de biomassa vegetal sob estresse hídrico, plantas tratadas com GB apresentam baixa eficiência de uso da água. Neste caso, a associação micorrízica arbuscular em plantas de J. curcas mostram-se mais eficientes. Com base nos resultados apresentados acima, pode-se concluir que a associação micorrízica arbuscular pode ser utilizada como um fator de atenuação das consequências do estresse hídrico em plantas de J. curcas.

6. REFERÊNCIAS

Agboma PC, Sinclair TR, Jokinen K, Peltonen-Sainio P, Pehu E. An evaluation of the effect of exogenous glycine betaine on the growth and yield of soybean: timing of application, watering regimes and cultivars. *Field Crops Res* 1997; 54: 51-64.

Allakhverdiev SI, Mohanty P, Murata N. Dissection of photodamage at low temperature and repair in darkness suggests the existence of an intermediate form of photodamaged photosystem II. *Biochem* 2003; 42:14277-14283.

Augé RM, Moore JL, Cho K, Stutz JC, Sylvia DM, Al-Agely A, Saxton AM. Relating dehydration resistance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *J Plant Physiol* 2003; 160: 1147-1156.

Augé RM, Toler HD, Sams CE, Nasim G. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycor* 2008; 18:115-121.

Augé RM. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. *Mycor* 2001; 11: 3-42.

Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular.arbuscularmycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 1988; 108: 211-218.

Boughalleb F, Hajlaoui H. Physiological and anatomical changes induced by drought in two olive cultivars (cv. Zalmati and Chemlali). *Acta Physiol Plant* 2010; 33: 1-13.

Brodribb TJ, Holbrook NM. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol* 2003; 132: 2166-2173.

Chartzoulakis K, Patakas A, Bosabalidis AM. Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environ Exp Bot* 1999; 42: 113-120.

Chazen O, Neumann PM. Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. *Plant Physiol* 1994; 104: 1385-1392.

Chen X, Tang JJ, Zhi GY, HU SJ. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Appl Soil Ecol* 2005; 28: 259-269.

Clark RB. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *J Agric Food Chem* 1975; 23: 458-460.

De Lucia HE, Whitehead D, Clearwater JM. The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in co-occurring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Funct Plant Biol* 2003; 30: 1197-1204.

Demiral T, Türkan I. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environ Exp Bot* 2006; 56: 72-79.

Denaxa NK, Roussos PA, Damvakaris T, Stournaras V. Comparative effects of exogenous glycine betaine, kaolin clay particles and Ambiol on photosynthesis, leaf sclerophylly indexes and heat load of olive cv. Chondrolia Chalkidikis under drought. *Sci Hortic* 2012; 137: 87-94.

Divakara BN, Upadhyaya HD, Wani SP, Laxmipathi GCL. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Appl Energy* 2010; 87: 732-742.

Evans J. Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within a Lucerne canopy. II. Stability with a theoretical optimum. *Aust J Plant Physiol* 1993; 20: 69-82.

Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant Cell Environ* 2008; 31: 602-621.

Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1989; 990: 87-92.

Grassi G, Magnani F. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell Environ* 2005; 28: 834-849.

Hamilton III EW, Heckathorn SA. Mitochondrial adaptations to NaCl: complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiol* 2001; 126: 1266-1274.

Hincha DK. High concentrations of the compatible solute glycinebetaine destabilize model membranes under stress conditions. *Cryobiology* 2006; 53:58-68.

International culture collection of vesicular arbuscularmycorrhizal fungi – INVAN <http://invam.caf.wvu.edu> (2012).

Keenan T, Garcia R, Friend AD, Zaehle S, Gracia C, Sabate S. Improved understanding of drought controls on seasonal variation in Mediterranean forest canopy CO₂ and water fluxes through combined in situ measurements and ecosystem modelling. *Biogeosciences* 2009; 6: 1423-1444.

Krause GH. Photoinhibition of photosynthesis – an evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant* 1988; 74: 566-574.

Krause GH, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; 42: 313-349.

- Lawlor DW, Cornic G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 2002; 25: 275-294.
- Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 1987; 148: 350-382.
- Ma QQ, Wang W, Li YH, Li DQ, Zou Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *J Plant Physiol* 2006; 163: 165-175.
- Maes WH, Trabucco A, WMJ Achten, B Muys. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass Bioenergy* 2009; 33: 1481-1485.
- Maggio A, Reddy MP, Joly RJ. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *Environ Exp Bot* 2000; 44: 31-38.
- Martinez-Ballesta MC, Martinez V, Carvajal M. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environ Exp Bot* 2004; 52:161-74.
- Mathur N, Vyas A. Influence of VA Mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *J Plant Physiol* 1995; 147: 328-330.
- Matos FS, Wolfgramm R, Gonçalves FV, Cavatte PC, Ventrella MC, DaMatta FM. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. *Environ Exp Bot* 2009; 67: 421-427.
- Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulias J, Flexas J. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann Bot* 2002; 89: 895-905.
- Moghaieb REA, Saneoka H, Fujita K. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritime*. *Plant Sci* 2004; 166: 1345-1349.

Oishi H, Ebina M. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J Plant Physiol* 2005; 162: 1077-1086.

Oxborough K, Baker NR. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynth Res* 1997; 54: 135-142.

Porcel R, Ruiz-Lozano JM. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot* 2004; 55: 1743-1750.

Rodríguez-Calcerrada J, Reich PB, Rosenqvist E, Pardos JA, Cano FJ, Aranda I. Leaf physiological versus morphological acclimation to high-light exposure at different stages of foliar development in oak. *Tree Physiol* 2008; 28: 761-771

Rouhi V, Samson R, Lemeur R, Van Damme P. Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environ Exp Bot* 2007; 59: 117-129.

Rousseaux MC, Benedetti JP, Searles PS. Leaf-level responses of olive trees (*Olea europaea*) to the suspension of irrigation during the winter in an arid region of Argentina. *Sci Hortic* 2007; 115: 135-141.

Roussos PA, Denaxa NK, Damvakaris T, Stournaras V, Argyrokastritis I. Effect of alleviating products with different mode of action on physiology and yield of olive under drought. *Sci Hortic* 2010; 125: 700-711.

SAEG (2007). Sistema de análises estatísticas e genéticas: versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes, Viçosa.

Slatyer RO. 1967. *Plant-Water Relationships*. Academic Press.

Teixeira J, Pereira S. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environ Exp* 2007; 60: 121-126.

Treberg JR, Driedzic WR. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 147: 475-83.

Wu QS, Zou YN, Xia RX. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *Eur J Soil Biol* 2006; 42: 166-172.

Wu WQ, Su XY, Xia Y, Wang YS, Luan LJ. An betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica* 2008; 159: 17-25.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos hídricos aplicados em plantas de *J. curcas* após 60 dias da inoculação das plantas com o *Glomus clarum*.

Tratamento	Descrição
WW	Plantas bem irrigadas
WWI	Plantas bem irrigadas e inoculadas com <i>G. clarum</i>
DS	Plantas submetidas ao déficit hídrico
DSI	Plantas submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com <i>G. clarum</i>
GB + WW	Plantas tratadas com GB e bem irrigadas
GB + WWI	Plantas tratadas com GB, bem irrigadas e inoculadas com <i>G. clarum</i>
GB + DS	Plantas tratadas com GB e submetidas ao déficit hídrico
GB + DSI	Plantas tratadas com GB, submetidas ao déficit hídrico e inoculadas com <i>G. clarum</i>

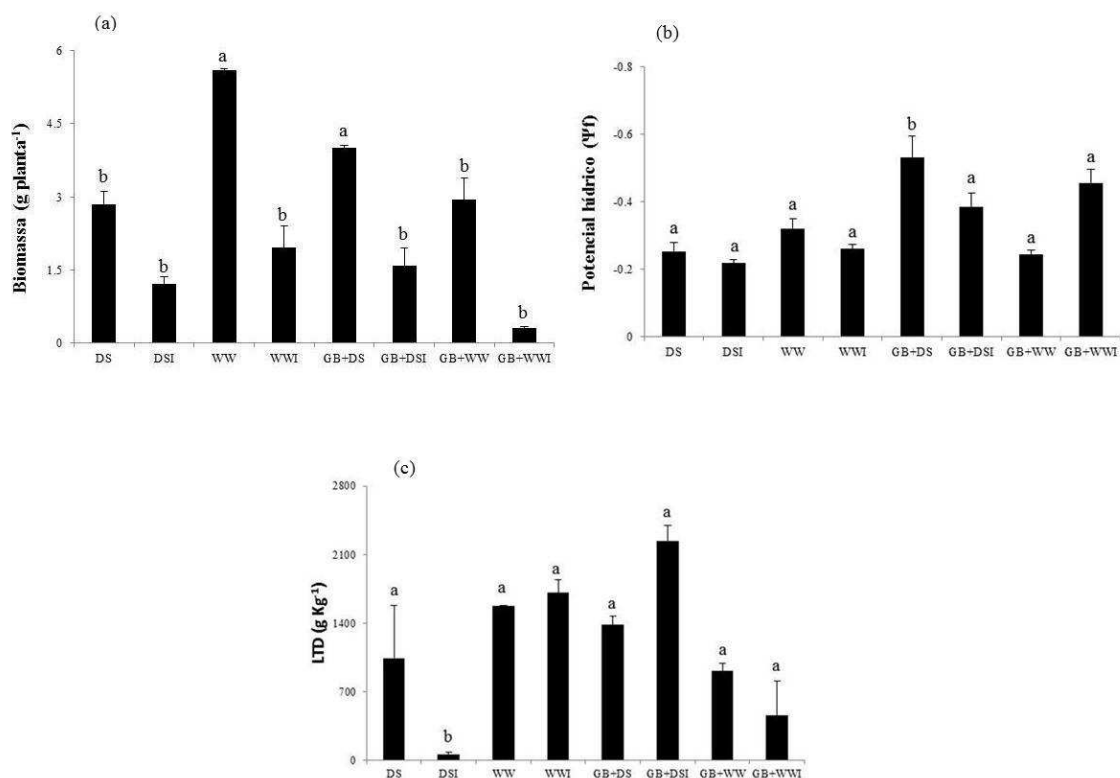


Figura 1. Biomassa seca total (a), potencial hídrico foliar na antemanhã (b), densidade do tecido foliar (LTD) (c) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

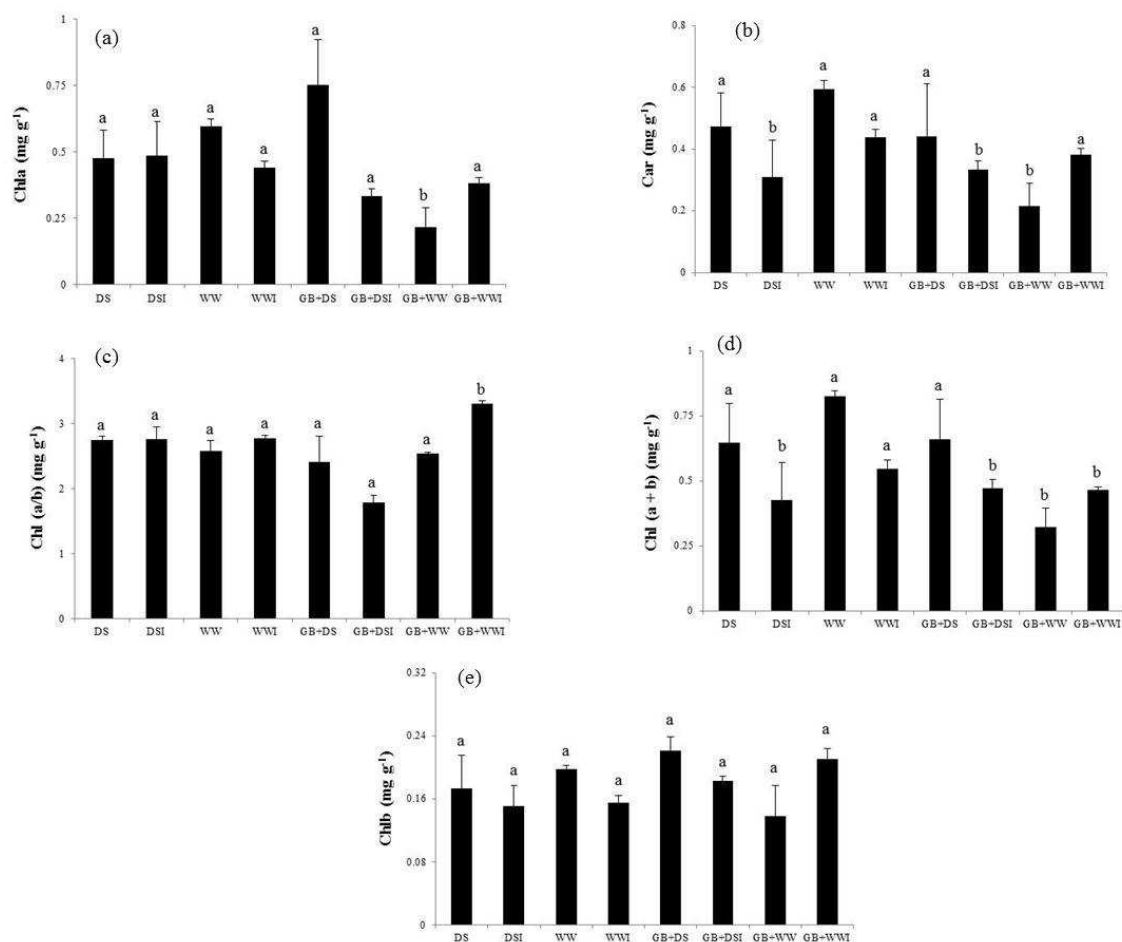


Figura 2. Teores de clorofila a (Chl a) (a), carotenoides (Car) (b), razão entre clorofila a e clorofila b (Chl (a/b)) (c), clorofila total (Chl (a+b)) (d) e clorofila b (Chl b) (e) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

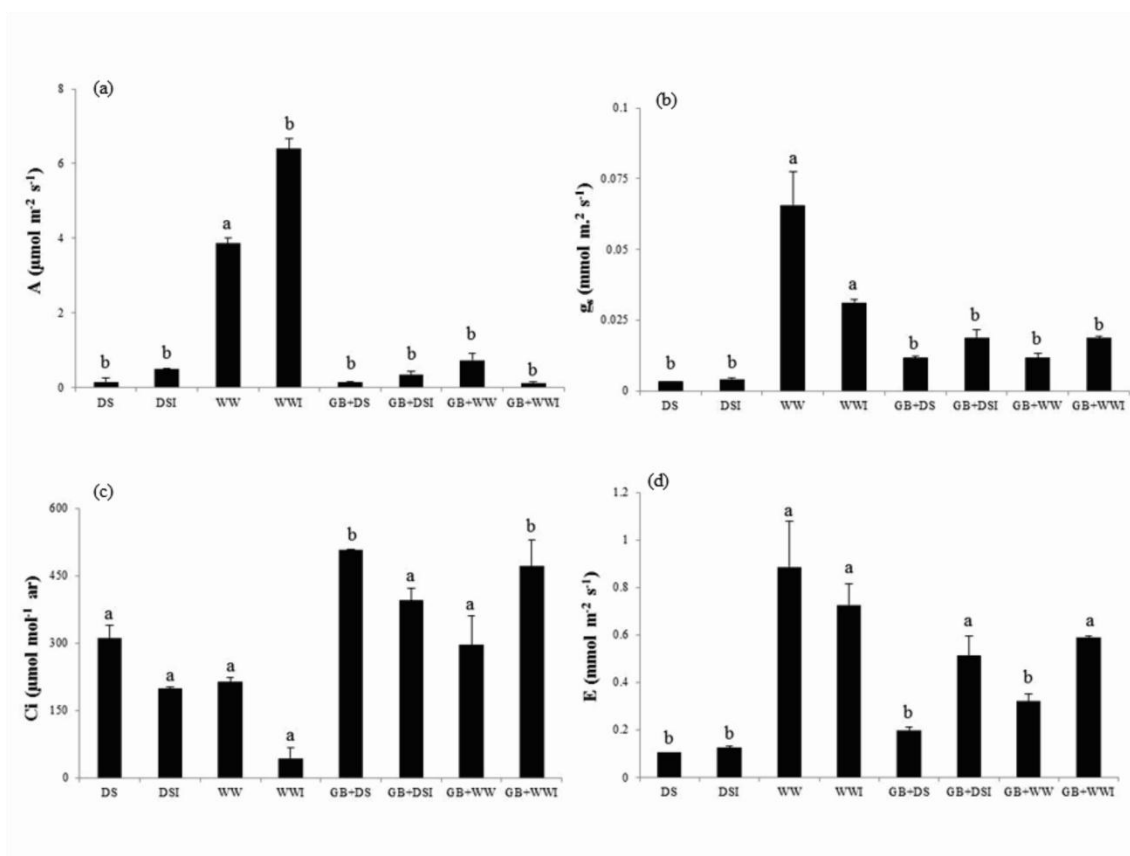


Figura 3. Taxa de assimilação líquida de carbono (A) (a), condutância estomática (g_s) (b), concentração interna de CO_2 (C_i) (c) e transpiração (E) (d) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

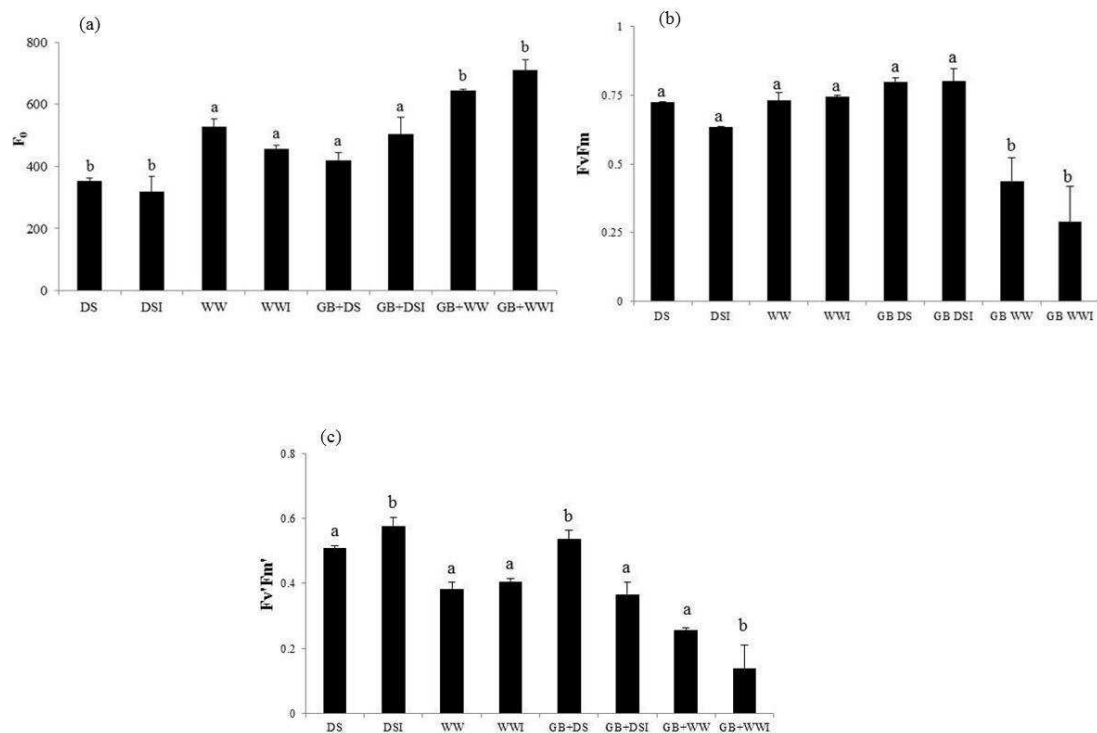


Figura 4. Fluorescência inicial (F_0) (a), eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m) (b) e eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII ($F_v'F_m'$) (c) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

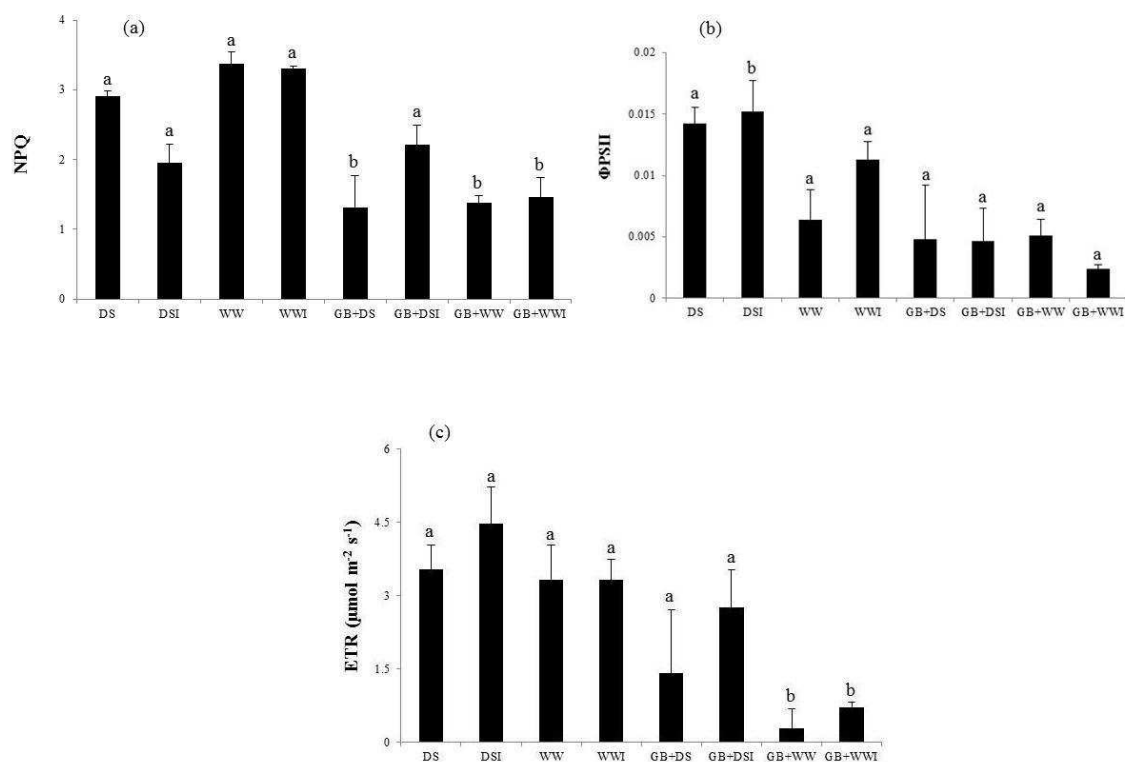


Figura 5. Coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) (a), eficiência quântica do transporte de elétrons do PSII (Φ PSII) (b) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (c) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

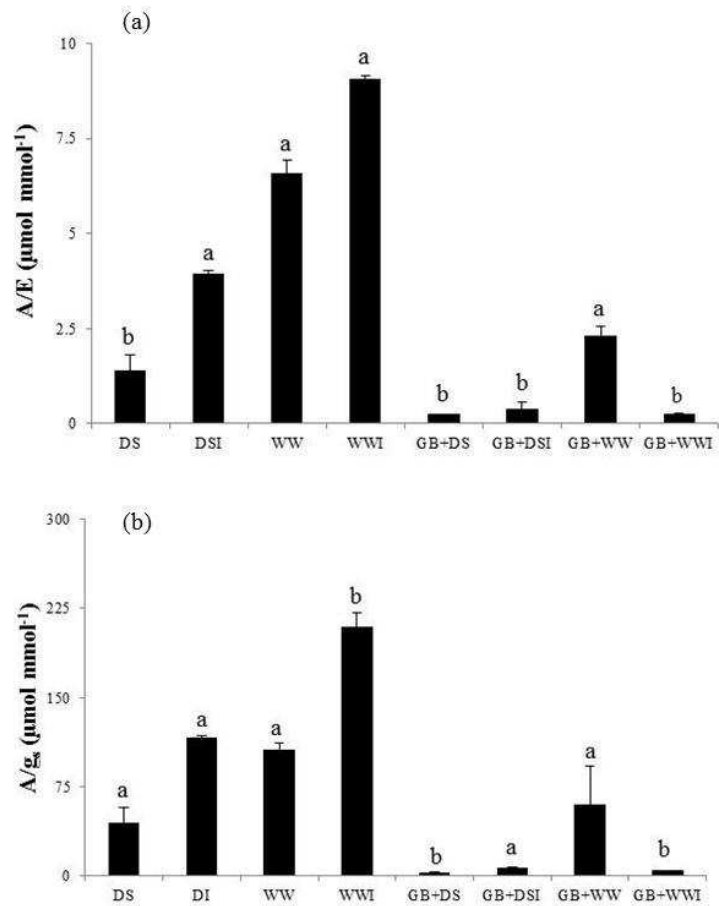


Figura 6. Eficiência instantânea (A/E) (a) e eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) (b) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (WW) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

CAPÍTULO IV

METABOLISMO DE OXIGÊNIO REATIVO É ALTERADO PELA APLICAÇÃO FOLIAR DE GLICINA BETAÍNA E MICORRIZA ARBUSCULAR EM PLANTAS DE PINHÃO-MANSO SOB ESTRESSE HÍDRICO

RESUMO

Jatropha curcas apresenta alta dependência pela associação micorrízica arbuscular, o que pode estar associada à sua rusticidade, tolerância à seca e à baixa exigência nutricional. Em condições de estresse há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), porém, as plantas possuem um sistema de defesa responsável pela sua remoção. Dentre estes sistemas, há as enzimas antioxidativas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX). Tendo como hipótese que a associação micorrízica arbuscular e aplicação foliar de GB aumentam a tolerância das mudas de pinhão-manso ao estresse hídrico, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito destes, sobre as atividades das enzimas do estresse oxidativo, teor de EROS e peroxidação de lipídeos em raízes e folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico. O estresse hídrico foi induzido pela suspensão da rega após a inoculação com *Glomus clarum* e aplicação de GB. Nas raízes, a colonização micorrízica reduziu acentuadamente a atividade da SOD, mas apenas em plantas sob estresse hídrico. A atividade das enzimas antioxidativas tanto nas folhas quanto nas raízes, foi, em geral, maior em plantas não micorrizadas do que em plantas micorrizadas (APX e CAT), quando submetidas ao estresse hídrico. Reduções na atividade da POX, CAT e APX, nas plantas micorrizadas não foram acompanhadas por aumento nos teores de H₂O₂. Plantas de pinhão-manso mostraram-se, naturalmente,

tolerantes ao estresse hídrico, apresentando teores de EROS similares aos encontrados nas plantas bem irrigadas, tanto nas folhas quanto nas raízes. A inoculação micorrízica diminuiu os teores de H₂O₂ nas raízes e folhas das plantas sob estresse hídrico, indicando menor acumulação de EROS em mudas micorrizadas. A inoculação com *G. clarum* modificou a peroxidação de lipídeos nas raízes das plantas submetidas ao estresse hídrico. Nas folhas, o tratamento com GB aumentou a peroxidação de lipídeos nas plantas sob estresse hídrico que foram previamente inoculadas com *G. clarum*. Plantas de pinhão-mansão, independente da ação de GB e *G. clarum*, apresentaram alta atividade de enzimas antioxidativas, indicando assim, que esta espécie possui sistema de defesa enzimático muito eficiente.

Palavras-chave: estresse oxidativo, enzimas antioxidativas, déficit hídrico, EROs.

1. INTRODUÇÃO

Os solos raramente fornecem as condições ideais para o crescimento e a sobrevivência de plantas e micro-organismos. Ao contrário, as plantas estão constantemente expostas a condições de estresse, que desencadeiam processos de resposta, causando alterações na expressão de genes e no metabolismo celular (Wu et al., 2006).

Sob diversas condições de estresse, a maioria das plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são beneficiadas (Smith e Read, 2008). Sendo assim, FMAs são críticos no estabelecimento e adaptação das plantas em locais severamente perturbados (Vallino et al., 2006), reduzindo as perdas por estresse (Munier-Lamy et al., 2007).

Um aspecto comum aos fungos e às plantas, quando submetidos a condições ambientais que resultam em estresse, é a geração de formas reativas de oxigênio

(EROs), tais como, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxílicos (HO^{\cdot}) (Allen e Tresini, 2000; Selote et al., 2004). Essas EROs reagem com macromoléculas e causam danos celulares (Bailey-Serres, 2006). A descontrolada acumulação de EROs gera estresse oxidativo e pode causar peroxidação lipídica na membrana, inativação de enzimas contendo grupos SH e danos em RNA e DNA. As EROs, particularmente o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são gerados no citoplasma, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e apoplasto.

Em plantas, os sistemas antioxidativos removem as EROs e protegem as células contra os danos causados pelo estresse oxidativo (Azcón et al., 2009). Os componentes desses sistemas incluem enzimas antioxidativas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e metabólitos do ciclo ascorbato-glutationa (Alscher et al., 2002). A síntese e a atividade dessas enzimas não são altas durante o crescimento normal das plantas; porém, quando as concentrações de superóxido ou peróxido de hidrogênio são elevadas, a síntese ou a atividade dessas enzimas é aumentada (Khan et al., 2009). Evidências sugerem que a seca pode causar dano oxidativo resultante do aumento das EROS e da incapacidade do sistema de defesa antioxidativo em remover tais espécies reativas (Smirnoff, 1993).

O estabelecimento de associações micorrízicas resulta em aumento da tolerância das plantas a estresses ambientais (Tang et al., 2009). No entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares responsáveis por essa maior tolerância. O aumento da atividade e a indução de novas isoenzimas que participam do sistema antioxidativo em plantas micorrizadas permite a remoção do excesso de EROs em condições de estresse e o aumento da tolerância das plantas.

Historicamente, as pesquisas têm demonstrado que o estabelecimento da associação micorrízica resulta no aumento da tolerância das plantas a fatores adversos do ambiente.

Embora muitos dos efeitos sejam atribuídos a uma melhor nutrição da planta associada aos FMAs (Folli-Pereira et al., 2012), o aumento da atividade e a indução de novas isoenzimas que participam do sistema antioxidativo em plantas micorrizadas permitem que a planta tolere o excesso de EROs gerados durante a prevalência de condições de estresse (Costa, 2003).

Informações sobre a resposta do sistema de defesa antioxidativo às condições de estresse em plantas micorrizadas são contraditórios: o aumento, nenhuma alteração, ou mesmo a diminuição da atividade de SOD, CAT, APX e POD foram relatados em plantas de soja micorrizadas submetidas ao estresse hídrico (Porcel et al., 2003) e tomate submetido à salinidade (He et al., 2007; Hajiboland et al., 2010).

Sob condições de déficit hídrico, as plantas tentam manter o seu índice de água acumulando solutos compatíveis, não tóxicos, e que não interferem com os processos fisiológicos normais da planta (Ma et al., 2006). Alguns desses compostos são a prolina e a glicina betaína (GB) (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008). O acúmulo desses solutos é um índice fisiológico sensível de plantas em responder ao estresse hídrico (Peng et al., 2008). Para as plantas sobreviverem sob condições de estresse hídrico, o ajuste do potencial osmótico foliar é muito importante e exige equilíbrio osmótico intracelular. Assim, sob estresse hídrico, as plantas acumulam alguns solutos orgânicos (prolina, açúcares solúveis, glicina betaína, entre outros) e íons inorgânicos para manter maior ajustamento osmótico (Yang et al., 2009).

A GB é, portanto, requerida para proteger a planta, mantendo o balanceamento de água entre a célula vegetal e o ambiente, estabilizando as macromoléculas (Chen e Murata, 2002). Entretanto, a função protetora de GB parece não depender apenas de sua capacidade osmoprotetora, mas também de efeitos fisiológicos e físico-químicos específicos na resposta das plantas ao estresse (Demiral e Türkan, 2004).

Inicialmente, atribuiu-se aos solutos compatíveis o papel principal no ajuste osmótico, porém alguns estudos têm sido relacionados com outras possíveis funções (Serraj e Sinclair, 2002). O acúmulo destes solutos por si só não pode ser completamente responsável pela tolerância osmótica, mas as vias que regem os mecanismos de tolerância são moduladas por estes fatores (Hasegawa et al., 2000). Uma hipótese adicional é que, os solutos compatíveis estão envolvidos também na redução da concentração de espécies reativas de oxigênio (Akashi et al., 2001; Chen e Murata, 2002).

As pesquisas relacionadas à função de GB no mecanismo de tolerância à seca envolvem mecanismos bioquímicos que podem ser estudados de duas formas: pela aplicação exógena de glicina betaína (Ma et al., 2006) ou pela produção de plantas melhoradas geneticamente (Zhou et al., 2008; Li et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer uma relação entre a formação de EROS nos tecidos radiculares e a atividade de enzimas relacionadas com a eliminação destes intermediários de oxigênio reativo, sob condições de estresse hídrico, verificando se a aplicação foliar de GB e colonização por FMAs alteram esta relação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. INÓCULO FÚNGICO

Utilizou-se esporos de FMA, *Glomus clarum*, mantidos em meio M, pH 5,5 com 0,4 % de Fitagel (Bécard e Fortin, 1988), pertencente à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas/BIOAGRO/UFV.

2.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS

Sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foram lavadas em água de torneira, e desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 % (v/v) por 15 min. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada esterilizada, retirando-se o tegumento. A desinfestação superficial em solução de NaOCl 4 % (v/v) por 15 min foi repetida e, posteriormente foram realizadas três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. As sementes foram, então, colocadas para germinar em bandejas contendo areia esterilizada, sendo irrigadas diariamente.

Quinze dias após a germinação, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos contendo substrato constituído de uma mistura de solo e areia (1:1, v/v) e inoculado com cubos de meio de cultura contendo hifas, raízes de cenoura transformada e 100 esporos do FMA *G. clarum*. No controle, as plantas foram transplantadas para vasos contendo cubos de meio de cultura com raízes de cenoura transformada sem FMA. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob luz natural, as plantas regadas diariamente e, quando necessário, aplicada solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), com ½ da força para P. Após 60 dias da inoculação com *G. clarum*, as plantas foram submetidas a diferentes tratamentos hídricos.

Assim, as plantas foram divididas em oito grupos: (1) WW= bem irrigadas e não tratadas com GB; (2) WWI= bem irrigadas, não tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum*; (3) DS= submetidas ao estresse hídrico e não tratadas com GB; (4) DSI= submetidas ao estresse hídrico, não tratadas com GB e inoculadas com *G. clarum*; (5) GB + WW= tratadas com GB e bem irrigadas; (6) GB + WWI= tratadas com GB, bem irrigadas e inoculadas com *G. clarum*; (7) GB + DS= tratadas com GB e submetidas ao estresse hídrico e, (8) GB + DSI= tratadas com GB, submetidas ao estresse hídrico e inoculadas com *G. clarum*.

Após estes tratamentos, raízes e folhas de *J. curcas* foram coletadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a - 80 °C até a realização das análises.

2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS

2.3.1. Obtenção dos extratos enzimáticos brutos

Os extratos enzimáticos foram obtidos pela maceração de aproximadamente 0,2 g de tecido foliar e radicular em N₂ líquido e, então, adicionado 2 mL de meio de homogeneização, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). O homogeneizado, depois de filtrado através de quatro camadas de gaze, foi centrifugado a 12.000 g por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático bruto.

2.3.2. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida a 25 °C numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa fechada. Após 5 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi medida a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). A absorbância a 560 nm, de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro, por igual tempo, serviu de “branco” e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de

SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

2.3.3. Determinação da atividade da peroxidase (POX, EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 25 mM pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM (Kar e Mishra, 1976). A atividade da POX foi determinada pelo acréscimo na absorbância a 420 nm, à temperatura de 25°C, durante o primeiro minuto de reação pela produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) e o resultado expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.4. Determinação da atividade da catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM (Havir e Mchale, 1987). O decréscimo na absorbância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm a 25°C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e expressa em μmoles de peróxido de hidrogênio min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.5. Determinação da atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da peroxidase do ascorbato foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993). Aliquotas de 0,1 mL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 2,9 mL de um meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1

mM. O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 290 nm a 25° C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) e o resultado expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

2.4. AVALIAÇÃO DOS TEORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

2.4.1. Determinação dos teores de ânion superóxido

Para determinação dos teores de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), amostras de tecido foliar e radicular de 0,2 g foram trituradas em N_2 líquido, e, então, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 7,2. Após filtração através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (Sha et al., 2001). Alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram adicionados em 2 mL de meio de reação constituído do sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na_2EDTA) 100 μM , β -nicotinamida adenina nucleotídeo reduzida (NADH) 20 μM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,2 (Mohammadi e Karr, 2001) em frascos hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N. Após este procedimento, as amostras foram incubadas a 28 °C sob agitação contínua por 5 min e iniciou-se a leitura da absorvância a 480 nm, durante 5 min. O branco foi realizado sob as mesmas condições, adicionando-se água ao invés do extrato enzimático. A produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi avaliada pela determinação da quantidade de adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de $4,0 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ (Boveris, 1984).

2.4.2. Determinação dos teores de H₂O₂

Para determinação dos teores de H₂O₂ amostras de tecido foliar e radicular de 0,2 g foram trituradas em nitrogênio líquido e, então, homogeneizadas em 2,0 mL de tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM. Após filtração através de quatro camadas de gaze, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, a 4°C, coletando-se o sobrenadante (Kuo e Kao, 2003).

Alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação constituído de FeNH₄(SO₄) 100 µM, ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 µM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm. Brancos para as cores dos reagentes e dos extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. As concentrações de H₂O₂ nas amostras foram estimadas com base em curva de calibração preparada com padrões de H₂O₂ (Merck, Rahway, NJ, USA) na faixa de 0,2–1,0 µM. A padronização de H₂O₂ foi realizada de acordo com Patterson et al. (1984). O peróxido de hidrogênio (30%, v/v) foi diluído a aproximadamente 10 mM em tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, padronizando sua absorvância a 240 nm utilizando o coeficiente de extinção molar de 40 M⁻¹ cm⁻¹.

2.5. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDIOS

Para determinação da peroxidação de lipídios amostras de 0,2 g de tecido foliar e radicular foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). Os homogeneizados foram filtrados através de quatro camadas de gaze e centrifugados a 12.000 g por 15 min. Todas as etapas necessárias ao processo de extração foram conduzidas a 4 °C. Alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v)

em TCA 20% (p/v), os tubos de ensaio foram fechados e incubados em banho-maria a 95° C. Após 30 min, a reação foi paralisada transferindo-se os tubos de ensaio para banho de gelo. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 g por 10 min e a absorbância dos sobrenadantes determinadas a 532 nm. A absorvância inespecífica a 600 nm foi medida e subtraída das amostras. A concentração do complexo aldeído malônico (MDA)-TBA foi calculada usando o coeficiente de absorvidade molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath e Packer, 1968).

2.6. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os teores de proteínas dos extratos enzimáticos foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

2.7. ESTRUTURAS TÍPICAS DA ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR

Para detecção da colonização micorrízica, os sistemas radiculares das plantas foram lavados em água, descorados em solução KOH 10 % e corados com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (Giovannetti e Mosse, 1980). As imagens das estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular foram observadas sob microscópio óptico (Olympus BX50) e capturadas utilizando a máquina digital (Qcolor 3 Olympus) e o programa QCapture Pro 6.0.0.412.

2.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial (2x2x2x6): dois tipos de tratamento hídrico (plantas bem irrigadas e

com suspensão da rega), dois níveis de GB (0 e 100 mM) e dois tratamentos (com e sem FMA), com 6 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 10% de probabilidade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAEG, versão 9.1 (SAEG, 2007).

3. RESULTADOS

Estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular, tais como hifas, vesículas, arbúsculos e esporos, foram observadas nas plantas de *J. curcas* inoculadas com esporos e hifas de *G. clarum* (Figura 1). A presença destas estruturas foi observada em todas as plantas inoculadas. Não foi observada a presença de quaisquer estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular nas plantas não inoculadas.

A atividade de superóxido dismutase (SOD) em raízes de plantas micorrizadas e naquelas tratadas com GB foi reduzida quando submetidas ao déficit hídrico (Figura 2a). Já nas folhas a inoculação com *G. clarum*, não alterou a atividade de SOD durante o déficit hídrico e, de forma geral, a atividade desta enzima foi aumentada pela aplicação foliar de GB, mesmo quando as plantas foram bem irrigadas e micorrizadas (Figura 3a).

Atividade de catalase (CAT) foi aumentada nas raízes das plantas sob estresse hídrico pela aplicação foliar de GB (Figura 2b), enquanto nas folhas, a ação combinada de GB e *G. clarum* reduziu significativamente a atividade desta enzima em plantas sob estresse hídrico (Figura 3b).

Quando a atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi avaliada em folhas de *J. curcas*, o efeito da micorriza arbuscular foi mais pronunciado em plantas bem irrigadas. Plantas micorrizadas expostas ao estresse hídrico apresentaram menor atividade desta enzima nas folhas (Figura 5a). Em raízes, plantas que foram tratadas com GB e sob

estresse hídrico apresentaram alta atividade de APX (Figura 4a). Em contrapartida, inoculação com *G. clarum* reduziu significativamente a atividade desta enzima nas raízes.

O estresse hídrico não afetou a atividade da peroxidase (POX) em raízes e não foram observadas diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos aplicados (Figura 4b). Em folhas, aplicação foliar com GB foi eficiente para aumentar a atividade de POX, apenas quando as plantas foram inoculadas com *G. clarum* (Figura 5b).

Quanto ao teor total de proteína nas plantas de *J. curcas*, o efeito dos tratamentos aplicados em plantas sob estresse hídrico foram mais pronunciados nas folhas do que nas raízes (Figura 6a e 6b).

O efeito do tratamento com GB foi mais pronunciado nas folhas do que nas raízes, quando a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi avaliada (Figura 7 e 8a). Enquanto nas raízes as plantas tratadas com GB e bem irrigadas apresentaram maior teor de H_2O_2 , nas folhas estas mesmas plantas, porém inoculadas com *G. clarum*, foram as que apresentaram maior de teor de H_2O_2 .

Quanto aos teores de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em plantas de *J. curcas*, o estresse hídrico resultou em aumento nas raízes e o tratamento com GB e com *G. clarum* não foram eficientes na redução da concentração desta EROS (Figura 7b). Nas folhas, a produção desta EROS foi aumentada em plantas bem irrigadas e tratadas com GB em relação à plantas sob estresse hídrico (Figura 8b).

A inoculação com *G. clarum* modificou a peroxidação de lipídeos nas folhas e raízes das plantas submetidas ao estresse hídrico (Figura 9a e 9b). Nas folhas, o tratamento com GB aumentou a peroxidação de lipídeos nas plantas sob estresse hídrico que foram previamente inoculadas com *G. clarum* quando comparas às plantas submetidas ao estresse hídrico que receberam apenas o tratamento com *G. clarum* (Figura 9a).

4. DISCUSSÃO

J. curcas é capaz de sintetizar e acumular GB, sendo este acúmulo aumentado quando a planta é exposta à algum tipo de estresse osmótico (Zhang et al., 2008; Kumar et al., 2010). Aplicação exógena de GB pode aumentar a tolerância de espécies de plantas a algumas condições de estresse abiótico, melhorando o crescimento e rendimento subsequente.

As atividades de praticamente todas as enzimas antioxidativas (CAT e SOD) foram aumentadas pela aplicação foliar de GB em condições de estresse hídrico (Figura 2 e 3). A partir destes resultados, pode ser sugerido que a aplicação foliar de GB pode contribuir para a eliminação das EROS em condições de estresse hídrico, pelo aumento da atividade destas enzimas. Plantas de *J. curcas* que receberam aplicação foliar de GB, apresentaram também menores teores de $O_2^{\cdot-}$ quando bem irrigadas (Figura 7b). SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 . Tal efeito diferencial da GB sobre a atividade da enzima SOD em plantas sob estresse hídrico foi observado em outras espécies de plantas (Demiral e Turkan, 2004). As plantas têm sistemas de defesa bem desenvolvidos contra EROS, que atuam na remoção das EROS. Para isso, as plantas eliminam as EROS através de enzimas antioxidativas, como superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT).

Nas raízes, colonização micorrízica reduziu acentuadamente a atividade da SOD, mas apenas em plantas sob estresse hídrico (Figura 2a). Em trabalho realizado por Porcel e Ruiz-Lozano (2004), resultados semelhantes foram observados, mostrando que a colonização micorrízica diminuiu significativamente a atividade da SOD em brotos de soja bem irrigada. No entanto, a atividade da SOD foi maior na parte aérea e raízes de *Lactuca sativa* colonizada por *G. mosseae* do que em plantas não-micorrizadas de *Lactuca sativa* sob condições de estresse hídrico (Ruiz-Lozano et al., 1996). Além

disso, três isoenzimas de SOD, incluindo Mn-SODI, Cu, Zn-SODI (M, 31000) e Cu, Zn-SODII (M, 34300) foram encontradas em folhas e raízes de *Trifolium pratense*, enquanto Cu, Zn-SOD (M, 40500) foram encontradas em esporos de *G. mosseae* (Palma et al., 1993). Duas novas isoenzimas, Mn-SODII (M, 37800) e Zn-SOD (M, 33300, também foram observadas nas raízes de *T. pratense* colonizadas por *G. mosseae*. Isto sugere que FMAs podem induzir novas isoenzimas de SOD nas raízes colonizadas. A simbiose micorrízica aumentou a expressão do gene Mn-SODII em plantas de alface ao estresse hídrico, que é, por sua vez, correlacionado com a tolerância desta planta ao estresse hídrico (Ruiz-Lozano et al., 2001).

Em plantas de pinhão-mansão, a atividade das enzimas antioxidativas tanto nas folhas quanto nas raízes, foi, em geral, maior em plantas não micorrizadas do que em plantas micorrizadas (SOD, APX e CAT), quando submetidas ao estresse hídrico. Em plantas de soja colonizadas por *G. intraradices* também houve menor atividade de APX em raízes e parte aérea em relação às plantas não micorrizadas antes e durante estresse hídrico (Porcel e Ruiz-Lozano, 2004). Entretanto, estes resultados são contrários aos resultados obtidos em três espécies arbustivas inoculadas com *G. claroidum* em um solo do semi-árido degradado (Alguacil et al., 2003), em plantas de *Glycine max* colonizadas com *G. etunicatum* e submetidas ao estresse osmótico (Ghorbanli et al., 2004), e em folhas de mudas de laranja colonizada por *G. mosseae* durante estresse hídrico (Wu et al., 2005). As diferenças na influência da micorriza arbuscular quanto à atividade das enzimas foram, talvez, devido à espécie de FMA utilizada, condições experimentais, à sanidade e fenologia da planta, que no presente estudo resultou em respostas diferentes de várias enzimas antioxidativas.

Em nosso estudo, reduções na atividade das enzimas POX, CAT e APX, nas plantas micorrizadas não foram acompanhados por aumento nos teores de H₂O₂, como era esperado (Figura 7a e 8a). Isto pode ser explicado pelo fato das EROS serem

produzidas continuamente como produtos de diversas vias metabólicas, mesmo quando as plantas não estão crescendo sob condições de estresse (Chen e Murata, 2008).

Quando as plantas superiores são submetidas a estresse hídrico, o equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROS é alterado, resultando em dano oxidativo a proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. MDA (aldeído malônico) é um dos subprodutos e pode refletir o grau de peroxidação de lípidos da membrana (Lacan e Baccou, 1998). No presente estudo, estresse hídrico aumentou a peroxidação de lipídeos em raízes, e em folhas o tratamento combinado de GB e *G. clarum* resultou em aumento de MDA, que foi relacionado com a produção de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 9).

Em plantas superiores, EROS são continuamente produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Apel e Hirt, 2004). Produção e remoção das EROS são estritamente controladas sob condições de rega normal.

Os teores de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ foram maiores nas plantas tratadas com GB, independente da imposição do estresse hídrico, resultando em peroxidação lipídica da membrana (Figura 8a, 8b e 9a). Tratamento com GB foi eficiente em reduzir o teor de H_2O_2 apenas mediante a imposição de estresse hídrico e quando as plantas não foram submetidas ao estresse hídrico, tratamento com GB provocou aumento no teor de H_2O_2 . Isto pode ser explicado pelo efeito inverso que GB pode provocar quando em excesso nas células, podendo provocar estresse oxidativo pelo excesso de água nas células.

Quando aplicada nas folhas das plantas, GB é prontamente absorvida pelos tecidos foliares (Park et al., 2006). GB também pode ser absorvido pelas raízes (Park et al., 2003). Quando GB é aplicado às folhas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), a maioria da GB absorvida pode ser localizada no citosol e apenas uma pequena fração de GB citosólica é translocada para cloroplastos (Park et al., 2006). Quando [^{14}C] GB foi aplicada às folhas de nabo (*Brassica rapa* L.), GB radiomarcada foi translocada às raízes dentro de duas horas (Park et al., 2003). Após 24 h da aplicação foliar de GB, GB

radiomarcada foi translocado para todas as partes da planta. Em plantas de tomate, grandes quantidades de GB aplicada às folhas foram translocadas para tecidos meristemáticos, incluindo botões florais e ápices caulinares. GB pode ser translocada para partes da planta crescendo ativamente e em expansão, sendo a translocação de GB entre partes mais distantes das plantas mediadas pelo floema (Mäkelä et al., 1996).

Estas EROS são eliminadas por uma variedade de sistemas de defesa antioxidativos, que mantem a homeostase celular. Todas as formas de estresse abiótico, incluindo estresse hídrico, causam uma explosão oxidativa em células vegetais. GB não afeta EROS diretamente, mas diminui os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, por exemplo, através da ativação ou estabilização de enzimas antioxidativas e/ou reprimindo a produção de EROS por um mecanismo ainda desconhecido (Chen e Murata, 2008).

Plantas de pinhão-mansão mostraram-se tolerantes ao estresse hídrico, apresentando teores de EROS similares aos encontrados nas plantas bem irrigadas, tanto nas folhas quanto nas raízes. Em parte das plantas, a inoculação micorrízica diminuiu os teores de H_2O_2 nas raízes e folhas das plantas sob estresse hídrico, indicando uma menor acumulação de EROS em mudas micorrizadas (Figura 7a e 8a). Salzer et al. (1999) utilizaram a técnica de coloração de diaminobenzidina para examinar a acumulação de H_2O_2 nas raízes de *Medicago truncatula* colonizadas por *G. intraradices*, mostrando que H_2O_2 acumulou-se em arbúsculos. Além disso, foi observado acúmulo de H_2O_2 em torno das pontas de hifas que penetravam a célula hospedeira. No entanto, acúmulo de H_2O_2 não foi observado nas pontas de hifas, apressórios e vesículas. Posteriormente, Fester e Hause (2005) observaram acúmulo intracelular de H_2O_2 no citoplasma de *Zea mays* colonizada por *G. intraradices* próximo a estruturas intactas e colapsadas das estruturas fúngicas, enquanto H_2O_2 intercelular foi localizado na superfície de hifas de fungos. Isto sugeriu que nas células de raízes micorrizadas, o acúmulo localmente

induzido de H₂O₂ foi limitado, tanto em hifas intracelulares quanto em hifas intercelulares superficiais.

As plantas que são tolerantes a determinado tipo de estresse, são muitas vezes, mais tolerantes a outros tipos, um fenômeno conhecido como tolerância cruzada (Bowler e Fluhr, 2000). Estresse hídrico pode causar estresse oxidativo em plantas superiores. Em plantas de pinhão-manso, a inoculação com *G. clarum* alterou o metabolismo do oxigênio reativo (EROS e enzimas antioxidativas), pelo menos parcialmente, aliviando o estresse oxidativo em condições de estresse hídrico. EROS são componentes centrais para o controle da tolerância cruzada, pelo menos ao nível celular. Portanto, colonização micorrízica pode influenciar a tolerância cruzada nas plantas hospedeiras. Maior ajustamento osmótico foi observado em algumas espécies de plantas, quando inoculadas com FMAs, durante estresse hídrico, sugerindo que a simbiose micorrízica pode, também, amenizar o estresse osmótico em condições de déficit hídrico (Wu e Xia, 2004). Assim, provavelmente a tolerância cruzada (por exemplo, estresse osmótico e estresse oxidativo) pode ocorrer em plantas micorrizadas e ser reforçada pela simbiose micorrízica. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar como, e quando, FMAs conferem tolerância cruzada aos seus hospedeiros em condições de estresse hídrico.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) Plantas de pinhão-manso mostram-se, altamente tolerantes ao estresse hídrico, apresentando teores de EROS similares aos encontrados nas plantas bem irrigadas, tanto nas folhas quanto nas raízes.

2) Plantas de pinhão-manso, independente da ação de GB e *G. clarum*, em geral apresentam alta atividade de enzimas antioxidativas, em alguns casos, mesmo quando bem irrigadas, indicando assim, a existência de sistema de defesa enzimático muito eficiente.

3) A tolerância diferencial das plantas de *J. curcas* neste estudo não se relaciona com a produção diferencial de EROS.

6. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akashi K, Miyake C, Yokota A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett* 508: 438-442, 2001.

Alguacil MM, Hernandez JA, Caravaea F, Portillo B, Roldan A. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiol Plant* 118:562-70, 2003.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad Bio Med* 28: 463-499, 2000.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1341, 2002.

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. *Plant Physiol* 109:1247-1257, 1995.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-99, 2004.

Azcón R, Perálvarez MC, Biro B, Roldán A, Ruíz-Lozano JM. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl Soil Ecol* 41: 168-177, 2009.

Bailey-Serres J, Mittler R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 141: 311, 2006.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287, 1971.

Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular.arbuscularmycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218, 1988.

Boveris A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105: 429-435. 1984.

Bowler C, Fluhr R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends Plant Sci* 5: 241-246, 2000.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976.

Chance B, Maehley AC. Assay of catalyses and peroxides. *Methods Enzymol* 2:764-775, 1955.

Chen THH, Murata N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol* 5: 250-257, 2002.

Chen THH, Murata N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci* 13: 499-505, 2008.

Clark RB. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *J. Agr. Food Chem*, 23: 458-460, 1975.

Costa FA. Micorrizas arbusculares e enzimas do estresse oxidativo em raízes de cenoura transformada em morangueiro. 2003. 92f. Tese (Doutorado em microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2003.

Del Longo OT, González A, Pastori GM, Trippi VS. Antioxidant defenses under hyper oxygenic and hyper osmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34: 1023-1028, 1993.

Demiral, T., Turkan, I. Does exogenous glycinebetaine affect antioxidant system of rice seedlings under NaCl treatment? *J Plant Physiol* 161: 1089-1100, 2004.

Fester T, Hause T. Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 15: 373-379, 2005.

Folli-Pereira MS, Meira-Haddad LS, Rasool N, Otoni WC, Kasuya MCM. Development of mycorrhized vitroplants of *Jatropha curcas* L. at different rooting stages. *Plant Biotechnol Rep* 2012. DOI 10.1007/s11816-012-0232-5

Gay C, Gebicki JM. A critical evolution of the effect of sorbitol on the ferric-xyleneol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem* 284: 217-220, 2000.

Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314, 1977.

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

Ghorbanli M, Ebrahimzadeh H, Sharifi M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidant enzymes in soybean. *Biol Plant* 48: 575-81, 2004.

Hajiboland R, Aliasgharzadeh A, Laiegh SF, Poschenrieder C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil* 31: 313-327, 2010.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499, 2000.

Havir EA, McHale NA. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455, 1987.

- He Z, He C, Zhang Z, Zou Z, Wang H. Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 59: 128-133, 2007.
- Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198, 1968.
- Kar M, Mishra D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315-319, 1976.
- Khan I, Ahmad A, Iqba M. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 626-634, 2009.
- Koshiha T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedling and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol* 34: 713-721, 1993.
- Kumar et al. Influence of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi and Salinity on Seedling Growth, Solute Accumulation, and Mycorrhizal Dependency of *Jatropha curcas* L. *J Plant Growth Regul* 29: 297-306, 2010.
- Kuo MC, Kao CH. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol Plantarum* 46: 149-152. 2003.
- Lacan D, Baccou JC. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in nonnetted muskmelon fruits. *Planta* 204: 377-82, 1998.
- Li QL, Gao XR, Yu XH, Wang XZ, An LJ. An, Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 25: 1431-1436, 2003.
- Ma QQ, Wang W, Li YH, Li DQ, Zou Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *J Plant Physiol* 163: 165-175, 2006.
- Mäkelä, P. et al. Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci* 121: 221-230, 1996.
- Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J Biol Chem* 246: 6886-6890, 1971.
- Mohammadi M, Karr AL. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J Plant Physiol* 158: 1023-1029, 2001.
- Munier-Lamy C, Deneux-Mustin S, Mustin C, Merlet D, Berthelin J, Leyval C. Selenium bioavailability and uptake as affected by four different plants in a loamy clay soil with particular attention to mycorrhizae inoculated ryegrass *J Environ Radioac* 97: 148-158, 2007.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880, 1981.

- Palma JM, Longa MA, del Rio LA, Arines J. Superoxide dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red clover plants. *Physiol Plant* 87:77-83, 1993.
- Park, E.J. et al. Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant Cell Physiol* 47: 706-714, 2006.
- Park, E.J. et al. Genetic engineering of cold-tolerant tomato via glycinebetaine biosynthesis. *Cryobiol Cryotech* 49: 77-85, 2003.
- Patterson BD et al. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Anal Biochem* 139: 487-492, 1984.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Santanna R, Mosquim PR, Moreira MA. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev Bras Fisiol Veg* 11: 137-143, 1999.
- Peng YL, Gao ZW, Gao Y, Liu GF, Sheng LX, Wang DL. Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *J Integr Plant Biol* 50: 29-39, 2008.
- Porcel R, Barea JM, Ruiz-Lozano JM. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytol* 157: 135-143, 2003.
- Porcel R, Ruiz-Lozano JM. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot* 55: 1743-1750, 2004.
- Ruiz-Lozano JM, Azcon R, Palma JM. Superoxide dismutase activity in arbuscular-mycorrhizal *Lactuca sativa* L. plants subjected to drought stress. *New Phytol* 134: 327-330, 1996.
- Ruiz-Lozano JM, Collados C, Barea JM, Azcon R. Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *J Exp Bot* 55: 1742-50, 2001.
- SAEG. Sistema de análises estatísticas e genéticas: versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, 2007.
- Salzer P, Corbiere H, Boller T. Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* 208: 319-25, 1999.
- Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes on growing rice seedlings. *Plant Sci* 161: 1135-1144, 2001.
- Selote DS, Bharti S, Khanna-Chopra R. Drought acclimation reduces O₂⁻ accumulation and lipid peroxidation in wheat seedlings. *Biochem Biophys Res Comm* 314: 724-729, 2004.

- Serraj R, Sinclair TR. Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ* 25: 333-341, 2002.
- Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27-58, 1993.
- Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic Press, London, 2008.
- Tang M, Chen H, Huang JC, Tian ZQ. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol Biochem* 41: 936-940, 2009.
- Vallino M, Massa N, Lumini E, Bianciotto V, Berta G, Bonfante P. Assessment of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. *Appl Environ Microb* 8: 971-983, 2006.
- Wu QS, Xia RX, Hu ZJ. Effects of arbuscular mycorrhiza on drought tolerance of *Poncirus trifoliata*. *Chin J Appl Ecol* 16: 459-463, 2005.
- Wu QS, Xia RX. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and osmotic adjustment matter content of trifoliolate orange seedlings under water stress. *J Plant Physiol Mol Biol* 30: 583-588, 2004.
- Wu QS, Zou YN, Xia RX. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *Eur J Soil Biol* 42: 166-172, 2006.
- Yang CW, Xu HH, Wang LL, Liu J, Shi, DC, Wang GD. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica* 47: 79-86, 2009.
- Zhang, FL. et al. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Sci* 174: 510-518, 2008.
- Zhou SF, Chen XY, Zhang XG, Li YX. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene SeNHX1. *Biotechnol Lett* 30: 369-376, 2008.

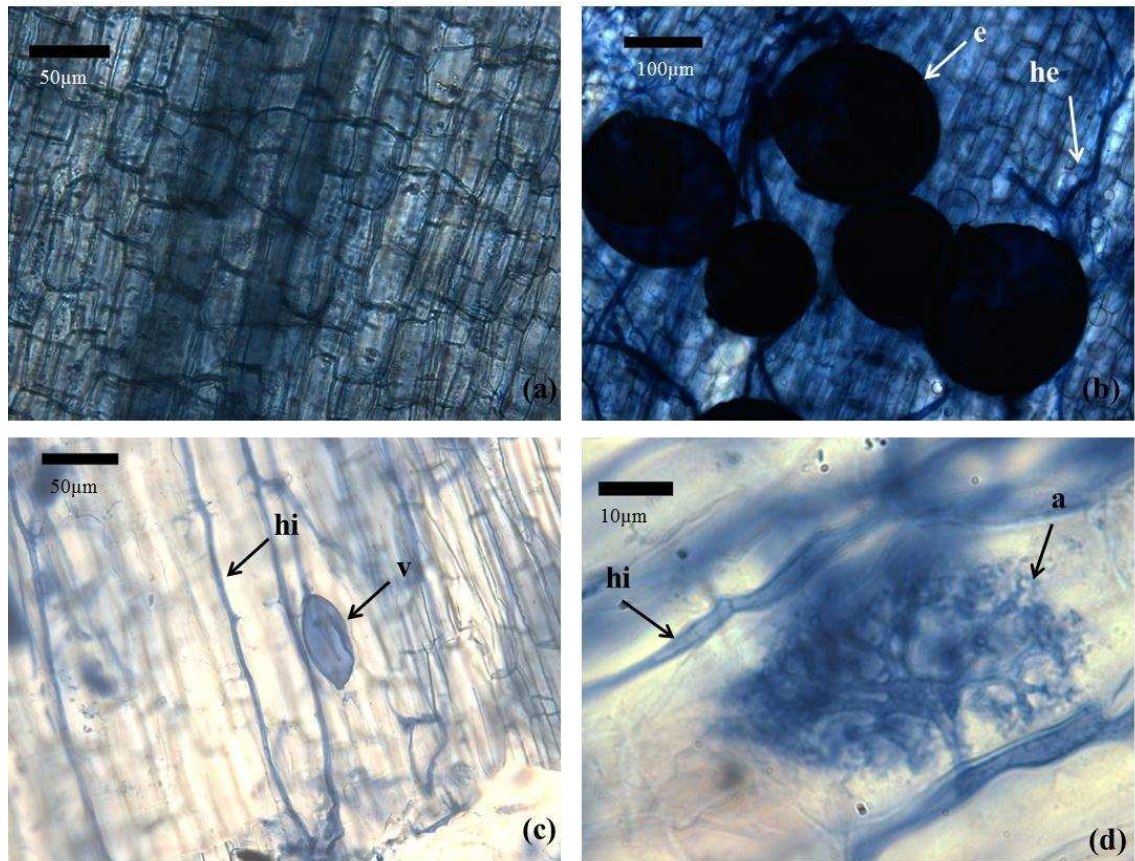


Figura 1. Fotomicrografia ótica de estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular produzidas em plantas de pinhão-mansó sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). (a): raiz de planta não inoculada com *Glomus clarum*; (b): esporos (e) e hifas extra radiculares (he); (c) Vesículas (v) e hifas intra radiculares (hi); (d): arbúsculo e hifas intra radiculares (hi).

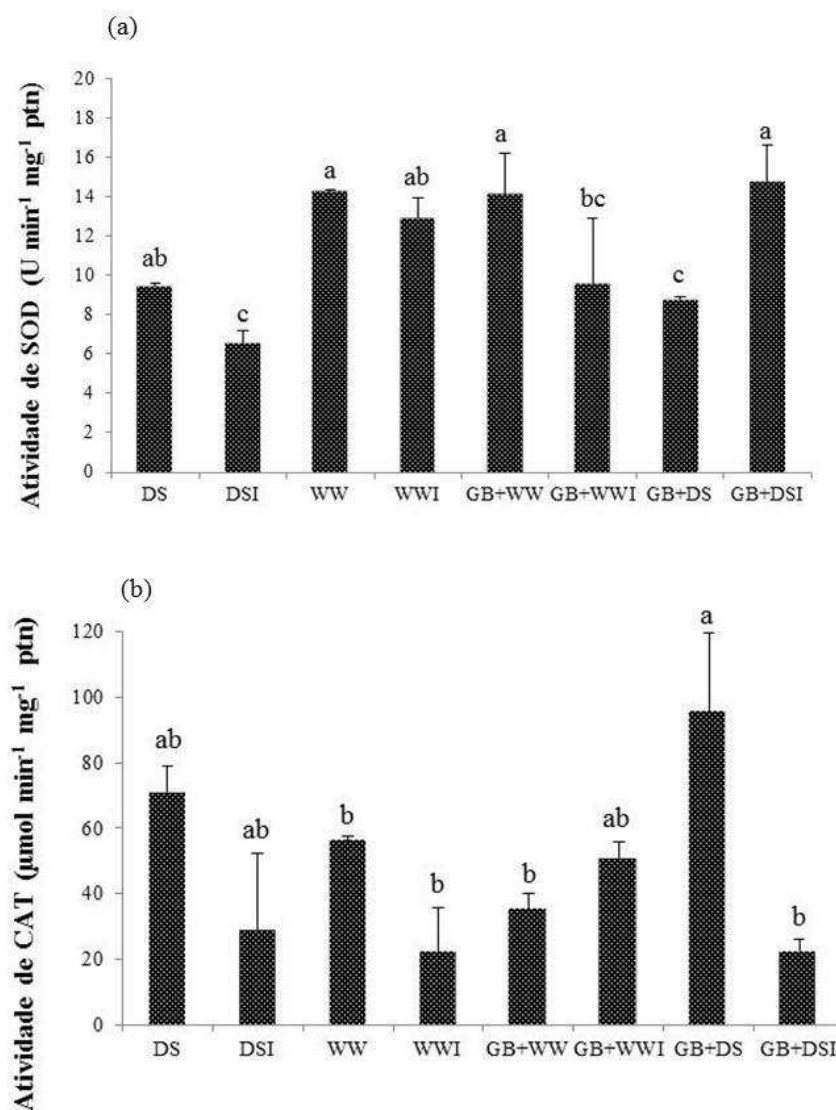


Figura 2. Atividade superóxido dismutase (SOD) (a) e catalase (CAT) (b) em raízes de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% probabilidade, pelo teste de Tukey.

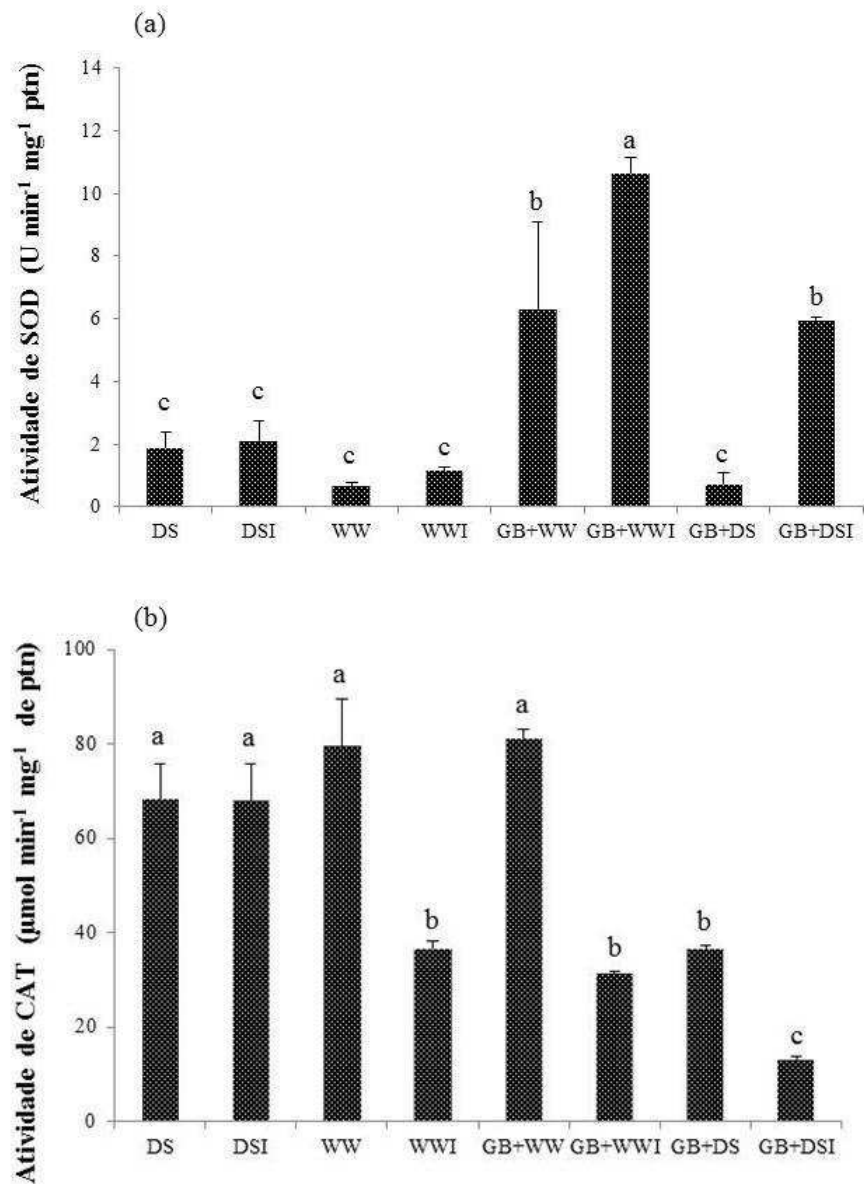


Figura 3. Atividade superóxido dismutase (SOD) (a) e catalase (CAT) (b) em folhas de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a probabilidade, pelo teste de Tukey.

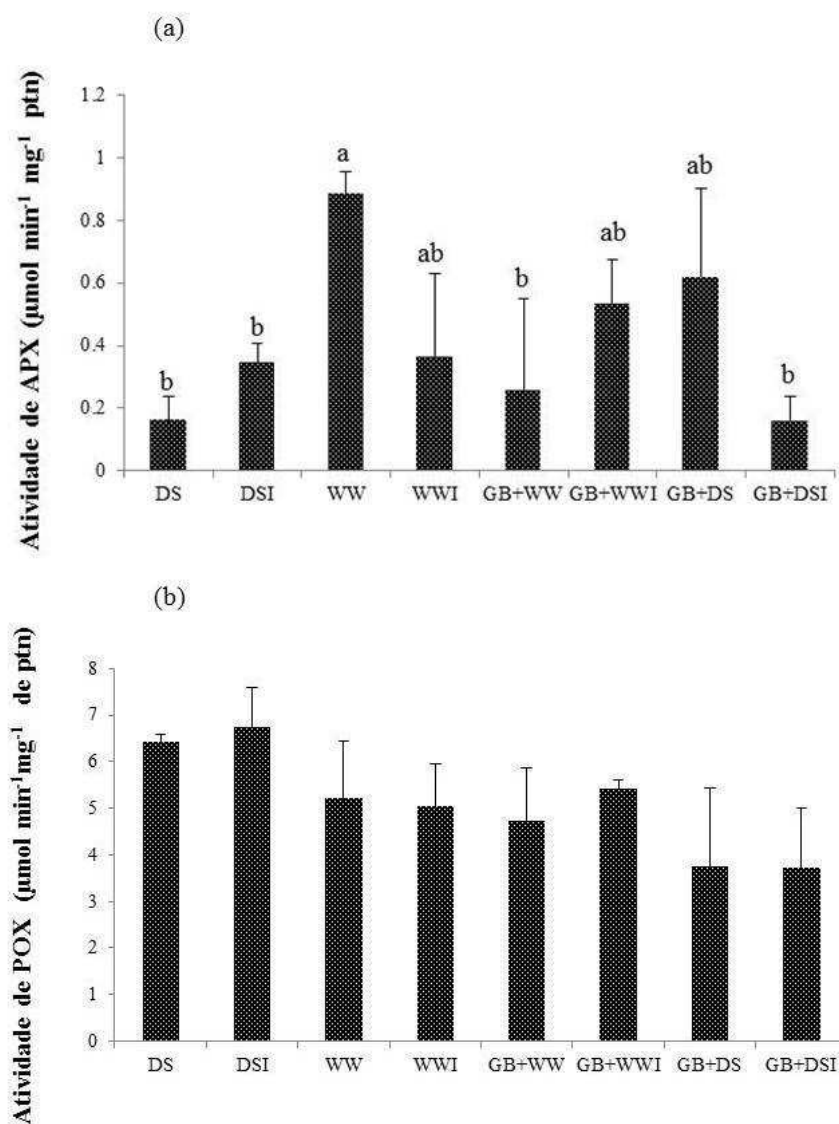


Figura 4. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) (a) e peroxidase (POX) (b) em raízes de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

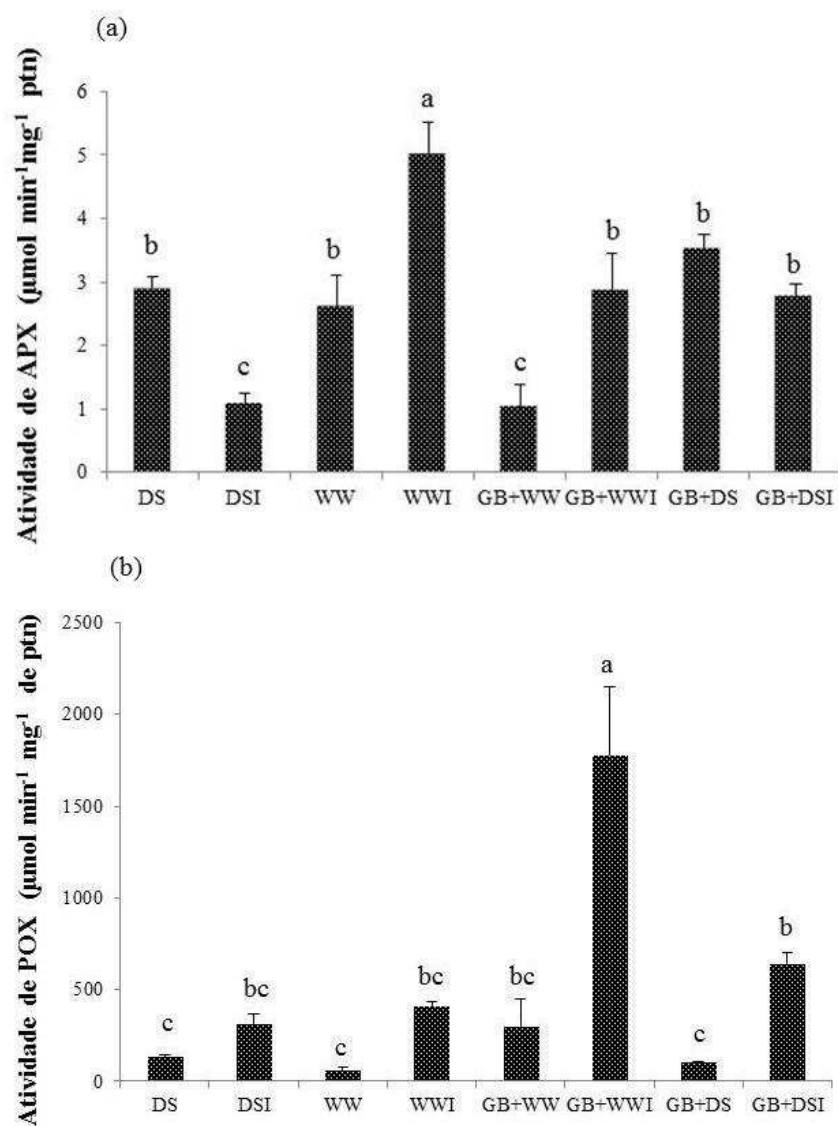


Figura 5. Atividade da ascorbato peroxidase (APX) (a) e peroxidase (POX) (b) em folhas de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

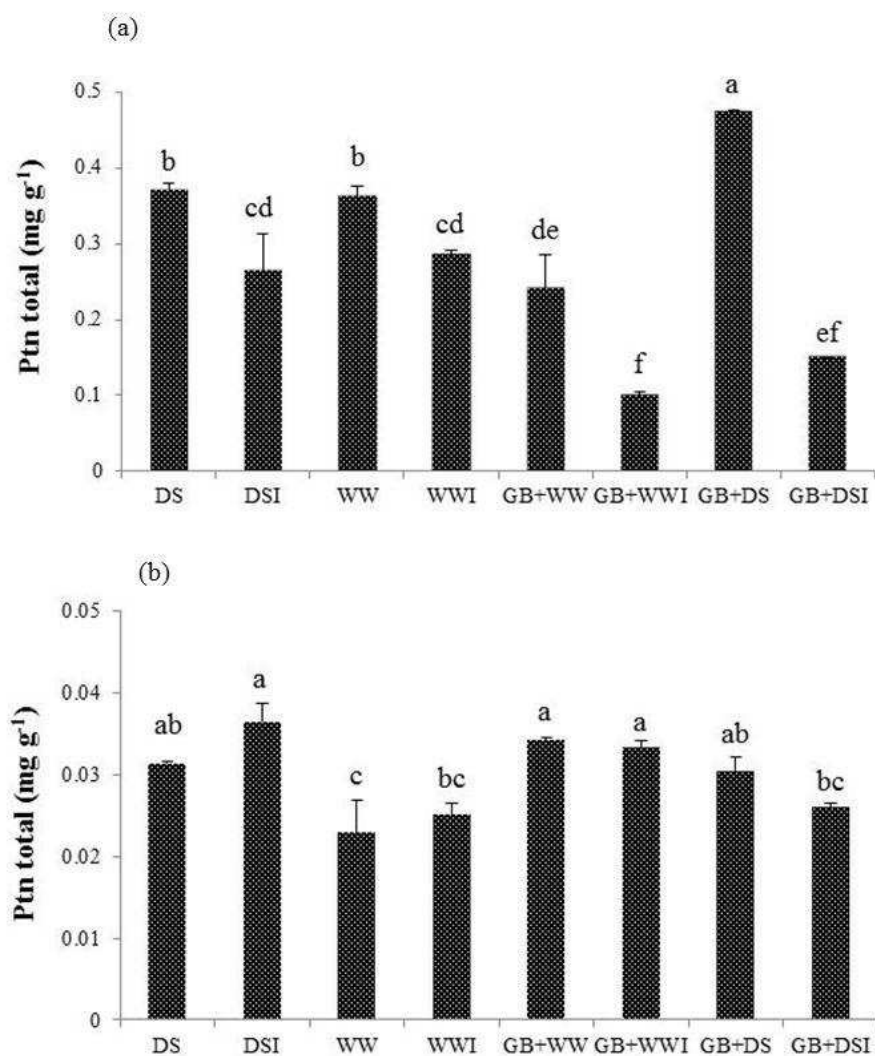


Figura 6. Teor de proteína total (Ptn) em folhas (a) e raízes (b) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

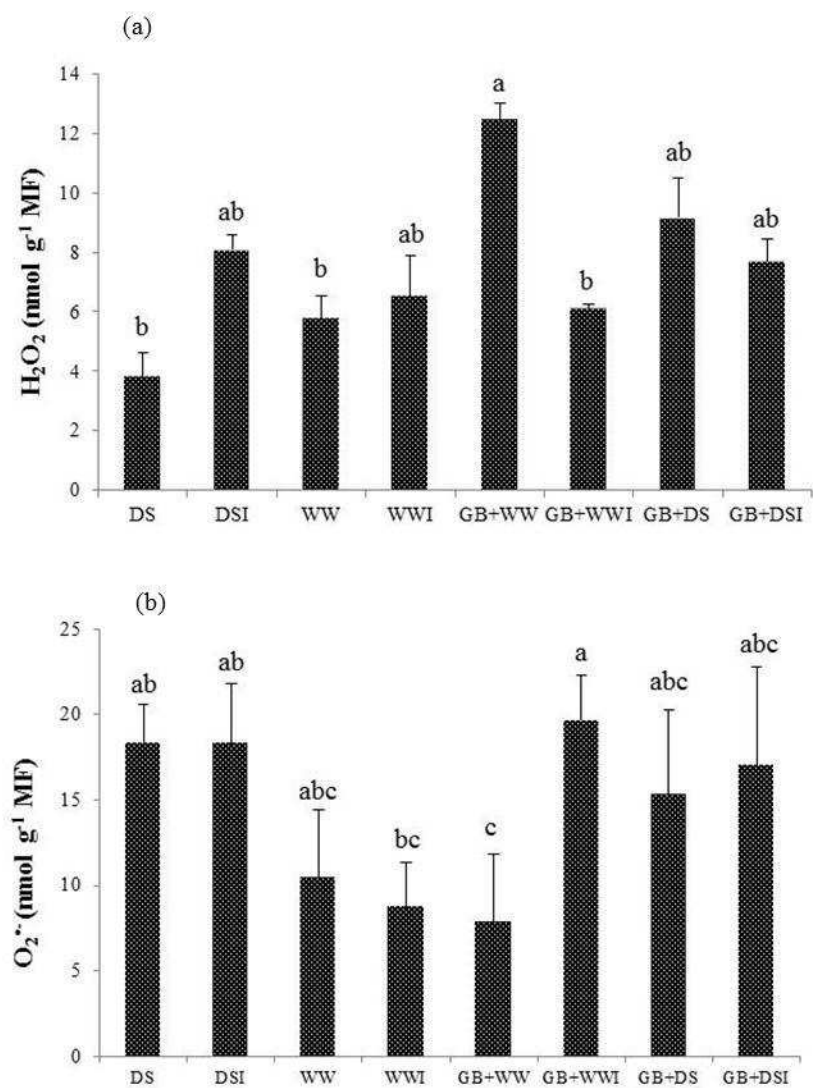


Figura 7. Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (a) e ânion superóxido (O₂⁻) (b) em raízes de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

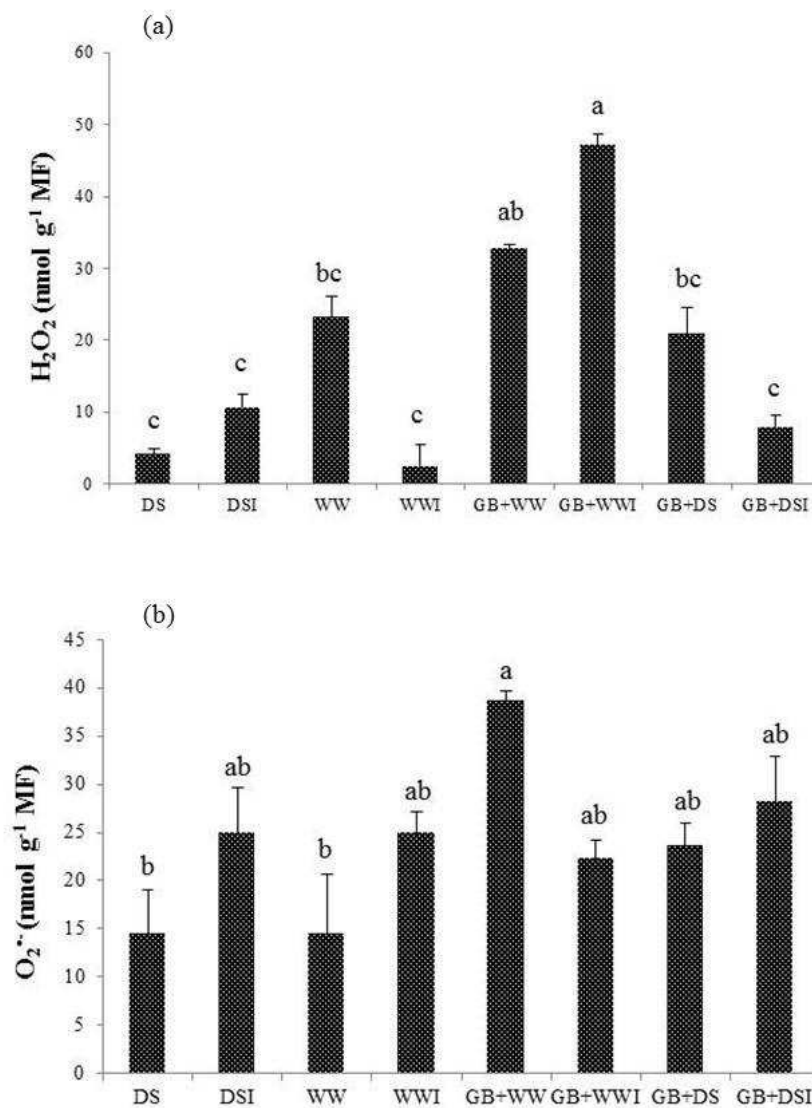


Figura 8. Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (a) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (b) em folhas de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a de probabilidade, pelo teste de Tukey.

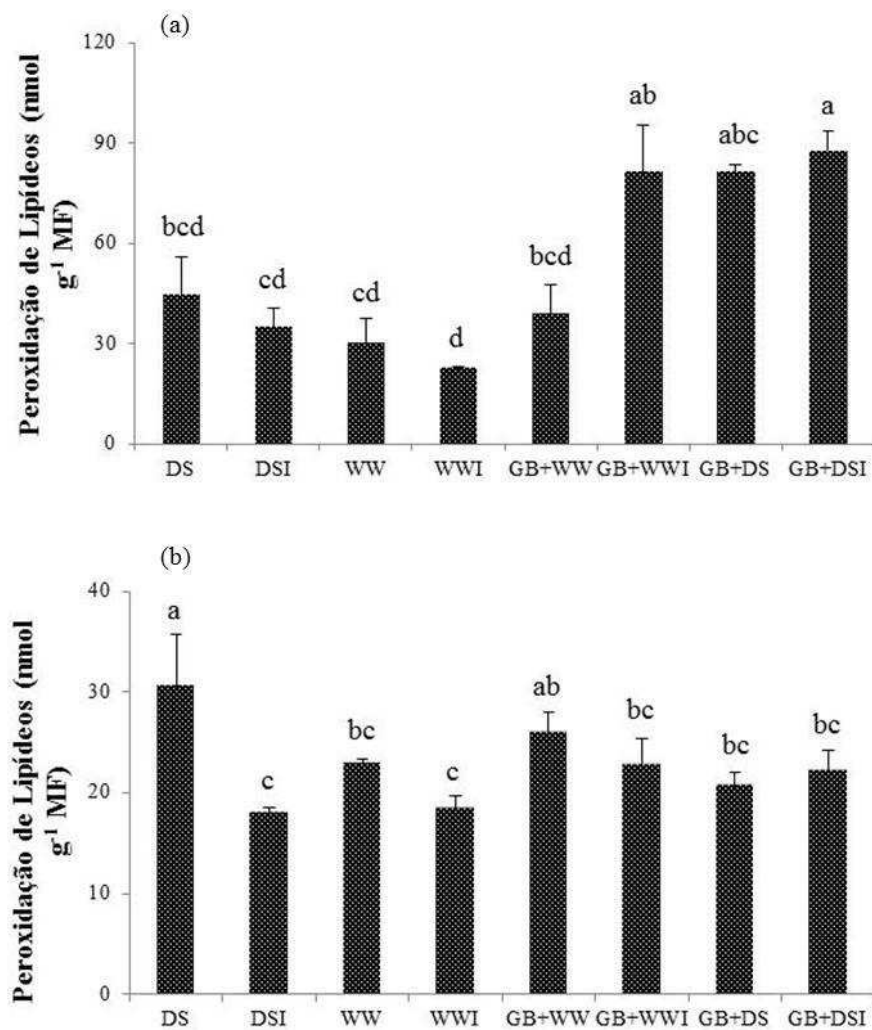


Figura 9. Peroxidação de lipídeos em folhas (a) e raízes (b) de plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes tratamentos hídricos (bem irrigadas - WW e suspensão de rega - DS), inoculadas com *Glomus clarum* (I) e tratadas com glicina betaína (GB). Barras seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente, a 10% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

CAPÍTULO V

MICORRIZA ARBUSCULAR AUMENTA A BIOSÍNTESE DE GLICINA BETAÍNA ENVOLVIDA NA ADAPTAÇÃO DE PLANTAS DE *Jatropha curcas* AO ESTRESSE AMBIENTAL

RESUMO

O cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como fonte de matéria-prima para produção de biodiesel tem crescido, e para isto a utilização de áreas marginais tem aumentado. Entretanto, a produção de biomassa vegetal nestas áreas é bastante reduzida, pois geralmente apresentam algum tipo de limitação, seja de disponibilidade de água, de salinidade ou de temperaturas e com grande variação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse salino, hídrico e térmico; e da interação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) sobre a expressão do gene JcBD1. O gene JcBD1 está envolvido na biossíntese de glicina betaína (GB), um importante soluto compatível acumulado nas células de plantas expostas às condições de estresse osmótico, sobre o conteúdo relativo de água e sobre a concentração de GB. Plantas de *J. curcas* foram inoculadas ou não com esporos de *Glomus clarum* e após 60 dias da inoculação as plantas foram submetidas a diferentes tipos de estresse abiótico: hídrico, salino e térmico. Parte das plantas foi submetida ao déficit hídrico, induzido pela suspensão da irrigação por dois dias e após, folhas, caules e raízes foram coletados para análises. O estresse salino foi induzido pela aplicação de solução de NaCl 600 mM ao substrato de crescimento das plantas, durante sete dias. O estresse térmico foi induzido pela exposição das plantas à temperatura de 50 °C, por 36 h. O gene JcBD1 teve sua expressão aumentada nas plantas micorrizadas submetidas às diferentes condições de estresse (estresse salino, hídrico e térmico). Os níveis de transcritos de JcBD1 nas plantas micorrizadas submetidas ao estresse salino, por exemplo, foram cerca de 75% maior do que os encontrados em plantas não inoculadas submetidas à mesma condição de estresse abiótico. Plantas micorrizadas sujeitas às condições de estresse salino e térmico acumularam mais GB e apresentaram maior conteúdo relativo de água em relação às plantas não micorrizadas. Conclui-se que a associação micorrízica em plantas de *J. curcas* modifica suas características fisiológicas, principalmente, pelo aumento na

produção de GB, em resposta aos estresses abióticos, o que faz com essa espécie vegetal tolere e se desenvolva em condições de limitação de recursos hídricos, salinidade e altas temperaturas.

Palavras-chave: BADH, FMAs, expressão gênica, GB, tolerância, JcBD1

1. INTRODUÇÃO

Plantas em situações adversas, como altas concentrações de sal e déficit hídrico, respondem a estas condições reduzindo o potencial osmótico, acumulando osmólitos que não perturbam as funções enzimáticas normais, de modo a manter a absorção contínua de água a partir do solo com baixo potencial hídrico (Robinson & Jones, 1986). O acúmulo desses solutos compatíveis (osmoprotetores), como a glicina betaína (GB), permite a manutenção do turgor e/ou a estabilização de proteínas e membranas contra os efeitos desestabilizadores de estresses abióticos, como alta salinidade, baixa disponibilidade de água e temperaturas extremas, que causam depleção de água das células (Heuer, 2003; Demiral & Türkan, 2006; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2008). Este composto parece ser um determinante crítico da tolerância ao estresse, sendo seu acúmulo correlacionado com o nível da tolerância (Moghaieb et al., 2004; Wu et al., 2008).

GB atua como um osmólito protetor não tóxico durante períodos de déficit hídrico em muitos organismos, incluindo algas, bactérias, plantas superiores e animais (Treberg & Driedzic, 2007). É sintetizada em elevadas concentrações em muitas espécies de plantas em resposta aos vários tipos de estresses ambientais, atuando não apenas como um osmoprotetor, mas também na estabilidade de membranas e proteínas (Hamilton & Heckathorn, 2001; Oishi & Ebina, 2005).

Portanto, GB é requerida para estabilizar as macromoléculas e proteger a planta, mantendo o balanceamento de água entre a célula vegetal e o ambiente (Chen & Murata, 2002; Rontein et al., 2002). De forma que as suplementações exógenas de GB protegem distintamente as plantas contra o estresse (Tijen & Ismail, 2006).

As plantas sintetizam GB por duas reações de oxidação da colina (Rhodes & Hanson, 1993). A primeira reação catalisada por uma colina mono oxigenase ferredoxina - dependente (CMO) e a segunda etapa por uma betaína aldeído desidrogenase NAD⁺ - dependente (BADH) (Chen & Murata, 2002; Rontein et al., 2002). A síntese se dá a partir de colina ou glicina, por duas vias distintas: desidrogenação da colina ou N-metilação da glicina (Rhodes & Hanson, 1993). Para quase todos os sistemas biológicos, incluindo a maioria das plantas e micro-organismos, a biossíntese de GB é realizada pela conversão da colina a GB em dois passos: uma oxigenação e uma desidrogenação, passando por um intermediário instável (betaína aldeído).

A maioria das enzimas biossintéticas de GB são induzidas por estresse (Moghaieb et al., 2004). O acúmulo de GB está associado a uma regulação positiva da expressão dos genes CMO e BADH concomitantemente, resultando em uma atividade enzimática elevada. Os principais fatores que limitam o acúmulo de GB são a disponibilidade de colina para que ocorra a reação de oxidação e seu eventual transporte dos cloroplastos até o citossol (Huang et al., 2000; Rontein et al., 2002).

Alguns genes BADH têm sido isolados e estudados, sendo observada maior tolerância de plantas transgênicas BADH ao sal em relação às plantas controle, com aumento aparente da atividade de BADH (Wu et al., 2008; Zhou et al., 2008). BADH desempenha um papel importante na tolerância das plantas à seca e à salinidade, especialmente de Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Poaceae, Avicenniaceae, entre outras (Wood et al., 1996).

Em muitas regiões áridas e semi-áridas o estresse hídrico tem limitado a produtividade das culturas e a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode melhorar as relações hídricas de muitas plantas (Maggio et al., 2000). Porcel e Ruiz-Lozano (2004) relataram que o potencial hídrico foliar é maior em soja micorrizada do que em plantas correspondentes não micorrizadas. No entanto, os mecanismos pelos quais os FMAs melhoram a tolerância à seca e o fluxo de água nas plantas hospedeiras continua obscuro.

Plantas associadas aos FMAs apresentam maior tolerância ao estresse salino, com maior consistência do que à seca, como demonstrado em bananeiras inoculadas com isolados de *Glomus* (Yano-Melo et al., 2003). Em milho, a maior tolerância das plantas micorrizadas foi relacionada à melhoria na osmoregulação e no acúmulo de solutos compatíveis (Feng et al., 2002). Outros autores associam essa resposta à melhoria na aquisição de P e crescimento das plantas (Sannazzaro et al., 2007).

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), um arbusto comumente encontrado em áreas tropicais e subtropicais, tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade científica, pelo fato de sua semente ser utilizada como matéria-prima para produção de biodiesel. Esta espécie tem mostrado alta tolerância à seca e à temperatura elevada. *J. curcas* apresenta alta dependência micorrízica, com porcentagem de colonização micorrízica superior à 76% em condições de campo (Carvalho, 2008). Em condições de estresse ambiental pode ocorrer, portanto, alteração da expressão do gene que codifica a enzima BADH e, conseqüentemente, o acúmulo de GB, em plantas de *J. curcas* associadas aos FMAs. Para investigar a relação entre a enzima BADH e a tolerância de *J. curcas* ao estresse abiótico, avaliou-se a expressão do gene codificante da enzima betaína aldeído desidrogenase1 (denominado JcBD1).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Inóculo fúngico e cultura monoaxênica

Utilizou-se esporos de FMA, *Glomus clarum*, mantidos em meio mínimo (M), pH 5,5 com 0,4 % de Fitagel (Bécarde & Fortin, 1988), pertencente à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas/BIOAGRO/UFV.

2.2. Material vegetal e tratamentos

Sementes de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) foram lavadas em água de torneira e desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 4 % (v/v) por 15 min. Em seguida, as sementes foram lavadas em água destilada esterilizada, retirando-se o tegumento. A desinfestação superficial em solução de NaOCl 4 % (v/v) por 15 min foi repetida e, posteriormente, foram realizadas três lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia autoclavada, sendo irrigadas conforme a necessidade. Quinze dias após a germinação, as plântulas de tamanho uniforme foram transplantadas para vasos contendo substrato constituído de uma mistura de solo e areia (1:1, v/v) e inoculado com cubos de meio de cultura contendo hifas, raízes de cenoura transformada e 100 esporos do FMA. No tratamento controle, foram adicionados cubos de meio de cultura com raízes de cenoura transformada, sem FMA. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob luz natural, e as plantas foram irrigadas quando necessário, e a solução nutritiva de Clark (1975), com ½ da força para P, foi utilizada em intervalos de 15 dias.

Após 60 dias da inoculação com *G. clarum*, as plantas foram submetidas a diferentes tipos de estresse abiótico: estresse hídrico, salino ou térmico. Parte das plantas foi submetida ao déficit hídrico, induzido pela suspensão da irrigação por dois

dias, sendo folhas, caules e raízes coletados para análises subsequentes. O estresse salino foi induzido pela aplicação de solução de NaCl 600 mM ao substrato de crescimento das plantas, durante 7 d. O estresse térmico foi induzido pela exposição das plantas à temperatura de 50 °C, por 36 h. Após estes tratamentos, folhas jovens de *J. curcas* foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a realização das análises.

2.3. Análise da expressão do gene *JcBD1* pela técnica RT-PCR (Real Time PCR)

A extração do RNA total de amostras de folhas jovens de *J. curcas* foi realizada em tampão CTAB, conforme metodologia proposta por Sangha et al. (2010), com pequenas adaptações. Após a extração, RNA total foi tratado com DNase e 1 µg deste RNA tratado foi utilizado para síntese da primeira fita de cDNA com oligo (dT)15 (Improm II, PROMEGA®, Madison, USA).

Os primers utilizados, *JcACTIN* e *JcBADH* (tabela 1) foram desenhados a partir de sequências altamente conservadas do gene *JcBD1* (número de acesso: EF174190.1) e *JcACTIN* (número de acesso: GQ256649.1) de *J. curcas* depositadas no GenBank, utilizando o programa PRIMER 3.

Para quantificar a expressão do gene *JcBD1*, as reações de polimerase em cadeia foram conduzidas no sistema de PCR em tempo real (BIORAD CFX 96). Para cada reação de PCR foram utilizados 1 µL da mistura de cDNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 1) e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) para concentração final de 1X, em um volume final de 25 µL por reação. O gene de *JcACTIN* (actina) de *J. curcas* foi utilizado como normalizador referencia. O cálculo da quantificação relativa foi realizado de acordo com o método do $2^{-\Delta\Delta C_T}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001). Os testes para a eficiência de amplificação e validação dos experimentos foram realizados como descrito por Pfaffl

(2001). Os experimentos foram repetidos seis vezes para cada ponto testado, utilizando seis preparações de RNA total obtido de amostras biológicas independentes.

2.4. Determinação de GB e status hídrico

O status hídrico (conteúdo relativo de água-RW) foi medido na parte mais alta das plantas e em folhas completamente expandidas de cada grupo de tratamento das plantas. O conteúdo relativo de água foi medido como descrito por Premachandra et al. (1994) e Ma et al. (2006).

O conteúdo de GB foi determinado como descrito por Chen et al. (2000) e Ma et al. (2006), em folhas completamente expandidas de cada grupo de planta.

2.5. Colonização micorrízica

A colonização radicular por FMAs foi estimada pelo método da contagem em placa marcada (Koske & Gemma, 1989). Para isso, as raízes foram descoradas em solução KOH 10 % (p:v), acidificadas com HCL 1% (v:v) por 24 h e coradas com azul de tripano 0,05 % em lactoglicerol (v:v) a 70 °C (Giovannetti & Mosse, 1980).

2.6. Análise estatística

Os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados, com 6 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Dunnett, a 5% de probabilidade. Todas as análises foram feitas utilizando o software SAEG versão 9.1 (SAEG, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colonização micorrízica das plantas de *J. curcas* inoculadas com *G. clarum* aumentou quando as mesmas foram submetidas às diferentes condições de estresse abiótico, confirmando, assim, a alta dependência micorrízica dessa Euphorbiaceae (Figura 1 e 5a).

A associação micorriza arbuscular em plantas de *J. curcas* não foi afetada negativamente pela salinidade (Figura 1). Este resultado contradiz as evidências de que a salinidade afeta negativamente a formação e funcionamento da simbiose micorrízica (Sheng et al., 2008), na qual a redução da colonização das raízes das plantas por alguns FMAs na presença de NaCl (Giri et al., 2007), pode ocorrer devido ao efeito direto de NaCl sobre determinadas espécies de fungos (Juniper & Abbott, 2006) indicando que a salinidade pode inibir a formação de micorrizas (He et al., 2007; Sheng et al., 2008).

Alguns estudos mostram que a salinidade reduz a porcentagem de colonização micorrízica em raízes de *J. curcas* (Kumar et al., 2010). Como os componentes e fatores controladores da associação micorrízica arbuscular apresentam interação constante e intensa, alterações que ocorram em qualquer um deles, exercerá influência sobre as micorrizas (Entry et al., 2002; Gucwa-Przepióra et al., 2007; Tang et al., 2009; Martinez & Johnson, 2010). Entretanto, dependendo da espécie de FMA, os efeitos dos distúrbios ambientais sobre a associação micorrízica arbuscular podem ser mínimos ou

inexistentes. Isto pode ser explicado pelo fato de algumas espécies de FMAs serem mais adaptadas à determinada condição de estresse que outras (Munkvold et al., 2004; Smith et al., 2004). Assim, a partir desse estudo pode-se sugerir que *G. clarum* é uma espécie de FMA adaptada às condições de estresses abióticos impostos sobre as plantas de *J. curcas*, sendo a associação micorrízica arbuscular importante ferramenta para o aumento da tolerância destas plantas ao estresse.

O conteúdo relativo de água nas folhas sob estresse abiótico foi inferior ao controle apenas quando as plantas foram expostas ao estresse salino ou térmico (Figura 2a e 2c) e nestas condições, a inoculação com *G. clarum* melhorou o status hídrico das plantas. Aumento no conteúdo relativo de água em plantas desta espécie em relação às plantas não micorrizadas sob estresse salino também foi observado com a inoculação de FMAs de diferentes espécies (Kumar et al., 2010). Assim, a simbiose com FMAs pode ter aumentado a resposta destas plantas por vários mecanismos, destacando-se: aumento da absorção de água a partir do solo pelas hifas (Augé et al., 2003); alteração dos níveis hormonais causando mudanças na condutância estomática (Augé et al., 2008); aumento da turgescência foliar e redução do potencial osmótico (Wu & Xia, 2006); e melhoria da nutrição da planta hospedeira (Chen et al., 2005).

A capacidade das plantas micorrizadas tolerar melhor o estresse salino pode estar associado à melhoria na absorção de água e nutrientes pelas plantas (Asghari et al., 2005), manutenção do equilíbrio iônico (Giri et al., 2007) e por proteger a atividade de enzimas (Rabie e Almadini, 2005), bem como, melhoria no conteúdo relativo de água (Colla et al., 2008), esta última evidenciada no presente estudo.

O gene *JcBD1* foi transcrito em todas as condições testadas, com oscilações em seu nível de abundância. Neste contexto, a expressão do gene *JcBD1* foi especialmente abundante nas plantas micorrizadas submetidas ao estresse salino (Figura 3a). Os níveis de transcritos de *JcBD1* em plantas micorrizadas foi 75% maior do que em plantas não

inoculadas, ambas submetidas ao estresse salino, e 59% maiores do que o controle. Resultados similares foram relatados em plantas de *J. curcas* submetidas ao estresse salino e não micorrizadas (Zhang et al., 2008), demonstrando que esse gene é expresso pela planta nestas condições e a associação micorrízica pode favorecer o aumento na expressão do gene *JcBD1*. Em muitas plantas, estresse salino poderia provocar aumento considerável nos níveis do RNA mensageiro (mRNA) correspondente a BADH (Hibino et al., 2001). Em sorgo, os níveis de mRNA BADH aumentaram aproximadamente 3,5 vezes, em resposta ao estresse salino (Saneoka et al., 2001).

Os níveis de GB examinados em plantas sujeitas ao estresse salino e térmico revelaram que as plantas micorrizadas acumularam mais GB em relação às plantas não micorrizadas (Figura 4a e 4c). Foram encontradas diferenças significativas ($p < 0.05$) nas concentrações GB entre as plantas inoculadas e não inoculadas com *G. clarum* apenas quando o estresse salino ou térmico foi imposto, o que não foi evidenciado nas plantas expostas ao estresse hídrico (Figura 4b e 5b). O aumento de GB seria causado pela ativação de enzimas após a imposição das condições de estresse. Portanto, o acúmulo de GB em níveis elevados, em plantas de *J. curcas*, substancialmente expressando o gene *JcBD1* e alta porcentagem de raízes colonizadas por FMAs, nestas condições de estresse (Figura 1), seriam um dos fatores responsáveis pela tolerância desta espécie às condições de estresses abióticos.

O acúmulo deste soluto é uma estratégia das plantas em resposta ao estresse osmótico (Peng et al., 2008). Para as plantas sobreviverem sob condições de estresse hídrico e salino, o ajuste do potencial osmótico foliar é muito importante e exige equilíbrio osmótico intracelular. Assim, sob estresse hídrico e salino, as plantas acumulam GB para realizar o ajustamento osmótico (Yang et al., 2009). Ao que tudo indica, a presença de FMAs nas raízes pode modificar o potencial osmótico das folhas

assim como eles têm mostrado influenciar a composição de carboidratos e o nível de GB.

GB é um soluto importante para ajustamento osmótico de *J. curcas* sob condições de estresse salino (Silva et al., 2010). Aparentemente, o elevado nível de GB em tecidos foliares de *J. curcas* é constitutivo, ou seja, sua síntese não é provocada pela seca (Figura 4) ou condições de salinidade (Silva et al., 2010).

Assim como o acúmulo de GB, a expressão de JcBD1 foi regulada pelo estresse salino em maior intensidade que os outros tipos de estresse abiótico. Estes resultados são consistentes com resultados relatados por vários pesquisadores, tanto para *J. curcas* quanto para outras espécies de plantas (Zhang et al., 2008; Moghaieb et al., 2004). Para os demais tipos de estresse abiótico, aumento de expressão gênica de JcBD1 não foram acompanhados por aumentos nas concentrações de GB nas plantas micorrizadas, o que pode ser atribuído, em parte, ao efeito dissipador dos FMAs associados às raízes das plantas.

4. CONCLUSÕES

Sob as condições de estresse abiótico, neste estudo, a colonização de *J. curcas* por *G. clarum* aumenta a expressão de JcBD1, concentração de GB e com melhora o status hídrico, desempenhando um papel essencial na tolerância ao estresse.

A associação micorrízica em plantas de *J. curcas* promove mudanças nas características fisiológicas destas plantas, principalmente pelo aumento na produção de GB, em resposta ao estresse abiótico, o que faz com que essa espécie vegetal tolere e se desenvolva em condições de limitação de recursos hídricos, salinidade e altas temperaturas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asghari H, Marschner P, Smith S, Smith F. 2005. Growth response of *Atriplex nummularia* to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi at different salinity levels. *Plant Soil* **273**:245–256.

Augé RM, Moore J.L, Cho K, Stutz JC, Sylvia DM, Al-Agely A, Saxton AM. 2003. Relating dehydration resistance of mycorrhizal *Phaseolus vulgaris* to soil and root colonization by hyphae. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1147–1156.

Augé RM, Toler HD, Sams CE, Nasim G. 2008. Hydraulic conductance and water potential gradients in squash leaves showing mycorrhiza-induced increases in stomatal conductance. *Mycorrhiza* **18**: 115–121, 2008.

Bécard G, Fortin JA. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**: 211-218.

Carvalho AMX. 2008. Fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento de mudas de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (in Portuguese)

Chen THH, Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 250-257.

Chen WP, Li PH, Chen THH. 2000. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environment* **23**: 609–618.

Chen X, Tang JJ, Zhi GY, Hu SJ. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology* **28**: 259-269.

Clark RB. 1975. Characterization of phosphatases of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**: 458-460.

- Colla G, Roupael Y, Cardarelli M, Tullio M, Rivera CM, Rea E. 2008.** Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology and Fertility of Soils* **44**: 501–509.
- Demiral T, Türkan I. 2006.** Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 72–79.
- Entry JA, Rygiewicz PT, Watrud LS, Donnelly PK. 2002.** Influence of adverse soil conditions on the formation and function of arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research* **7**: 123-138.
- Feng G, Zhang F, Li X, Tian C, Tang C, Rengel Z. 2002.** Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza* **12**: 185-190.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489–500.
- Giri B, Kapoor R, Mukerji KG. 2007.** Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology*, **54**: 753-760.
- Gucwa-Przepióra E, Malkowski E, Sas-Nowosielska A, Kucharski R, Krzyzak J, Kita A, Römken PFAM. 2007.** Effect of chemophytostabilization practices on arbuscular mycorrhiza colonization of *Deschampsia cespitosa* ecotype Waryński at different soil depths. *Environmental Pollution*, **150**: 338-346, 2007.
- Hamilton III EW, Heckathorn SA. 2001.** Mitochondrial adaptations to NaCl: complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* **126**: 1266–1274.
- He Z, He C, Zhang Z, Zou Z, Wang H. 2007.** Changes of antioxidative enzymes and cell membrane osmosis in tomato colonized by arbuscular mycorrhizae under NaCl stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* **59**: 128–133.
- Heuer B. 2003.** Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* **165**: 693–699.

Hibino T, Meng YL, Kawamitsu Y, Uehara N, Matsuda N, Tanaka Y, Ishikawa H, Baba S, Takabe T, Wada K, Ishii T, Takabe T. 2001. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh., *Plant Molecular Biology* **45**: 353–363.

Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G. 2000. Genetic engineering of glycine betaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology* **122**: 747-756.

Juniper S, Abbott LK. 2006. Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **16**: 371–379.

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

Kumar A, Sharma S, Mishra S. 2010. Influence of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi and Salinity on Seedling Growth, Solute Accumulation, and Mycorrhizal Dependency of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**: 297-306.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402-408.

Ma QQ, Wang W, Li YH, Li DQ, Zou Q. 2006. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. *Journal of Plant Physiology* **163** (2): 165-175.

Maggio A, Reddy MP, Joly RJ. 2000. Leaf gas exchange and solute accumulation in the halophyte *Salvadora persica* grown at moderate salinity. *Environmental and Experimental Botany* **44**: 31-38.

Martinez TN, Johnson NC. 2010. Agricultural management influences propagule densities and functioning of arbuscular mycorrhizas in low- and high-input agroecosystems in arid environments. *Applied Soil Ecology* **46**: 300-306.

Moghaieb REA, Saneoka H, Fujita K. 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression

in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritime*. *Plant Science* **166** (5): 1345-1349.

Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **164**: 357-364.

Oishi H, Ebina M. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *Journal of Plant Physiology* **162**: 1077-1086.

Peng YL, Gao ZW, Gao Y, Liu GF, Sheng LX, Wang DL. 2008. Eco-physiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt-alkaline stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**(1): 29-39.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** (9): 21-30.

Porcel R, Ruiz-Lozano JM. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1743-1750.

Premachandra GS, Hahn DT, Joly RJ. 1994. Leaf water relations and gas exchange in two grain sorghum genotypes differing in their pre- and postflowering drought tolerance. *Plant Physiology* **143**: 96–101.

Rabie GH, Almadini AM. 2005. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants. *African Journal of Biotechnology* **4**: 210–222.

Rhodes D, Hanson AD. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 357-384.

Robinson SP, Jones GP. 1986. Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 659-668.

Rontein D, Basset G, Hanson AD. 2002. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering* **4**: 49-56.

SAEG. Sistema de análises estatísticas e genéticas: versão 9.1. Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, 2007.

Saneoka H, Ishiguro S, Moghaieb REA. 2001. Effect of salinity and abscisic acid on accumulation of glycinebetaine and betaine aldehyde dehydrogenase mRNA in Sorghum leaves (*Sorghum bicolor*). *Journal of Plant Physiology* **158 (7)**: 853-859.

Sangha JS, Gu K, Kaur J, Yin Z. 2010. An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seeds of *Jatropha curcas* L. *BMC Research notes* **3**: 126-131.

Sannazzaro AI, Echeverría M, Albertó EO, Ruiz OA, Menéndez A. B. 2007. Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology Biochemistry* **45**: 39-46.

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**: 287–296.

Silva EN, Ferreira-Silva, SL, Viégas RA, Silveira JAG. 2010. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environmental and Experimental Botany* **69**: 279-285.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. 2004. Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth and total P uptake. *New Phytologist* **162**: 511-524.

Tang M, Chen H, Huang JC, Tian ZQ. 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology and Biochemistry* **41(5)**: 936-940.

Tijen D, Ismail T. 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress, *Environmental and Experimental Botany* **56**: 72-79.

Treberg JR, Driedzic WR. 2007. The accumulation and synthesis of betaine in winter skate (*Leucoraja ocellata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **147(2)**: 475-83.

Wood AJ, Saneoka HD, Rhodes RJ, Joly PB. 1996. Goldsbrough, Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. *Plant Physiology* **110 (4)**: 1301-1308.

Wu QS, Zou YN, Xia RX. 2006. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *European Journal of Soil Biology* **42**: 166–172.

Wu WQ, Su XY, Xia Y, Wang YS, Luan LJ. 2008. An, The Suaeda liaotungensis kitag betaine aldehyde dehydrogenase gene improves salt tolerance of transgenic maize mediated with minimum linear length of DNA fragment. *Euphytica* **159**: 17-25.

Yang CW, Xu HH, Wang LL, Liu J, Shi DC, Wang GD. 2009. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants. *Photosynthetica* **47(1)**: 79-86.

Yano-Melo AM, Trufem SFB, Maia LC. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in salinized and surrounded areas at the São Francisco Submedium Valley, Brazil. *Hoehnea* **30(2)**: 79-87.

Zhang F-L, Niu B, Wang Y-C, Chen F, Wang S-H, Xu Y, Jiang L-D, Gao J, Wu J, Tang L, Jia Y-J. 2008. A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science* **174**: 510-518.

Zhou SF, Chen XY, Zhang XG, Li YX. 2008. Improved salt tolerance in tobacco plants by co-transformation of a betaine synthesis gene BADH and a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene SeNHX1. *Biotechnology Letters* **30**: 369-376.

Tabela 1: Sequencias de oligonucleotídeos para as reações de PCR em tempo real

Gene alvo	Identificação dos oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'	Produto do PCR
Actina	JcACTIN-R	TCAGCAGTGGTGGTGAACAT	101
	JcACTIN-L	CCACATGCTATCCTCCGTCT	101
BADH	JcBADH-R	TCACCTGCTTCACACTCAGG	101
	JcBADH-L	ATGCTTCTGTCAGGCTCCAT	101

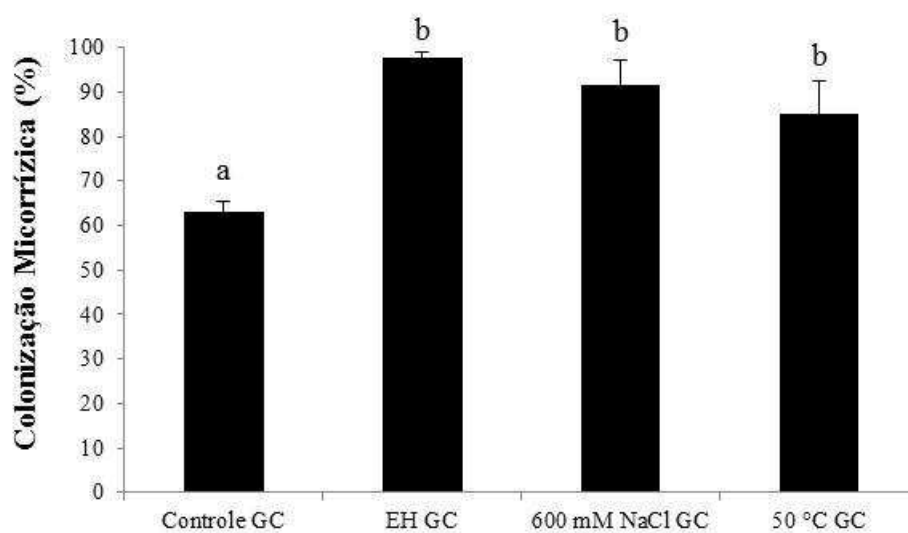


Figura 1. Porcentagem de raízes de plantas de *Jatropha curcas* colonizadas por *Glomus clarum* sob diferentes condições de estresse (suspensão da rega- **EH** e bem irrigadas- **Controle**) e inoculadas com *G. clarum* (GC). Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (**Controle - GC**) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

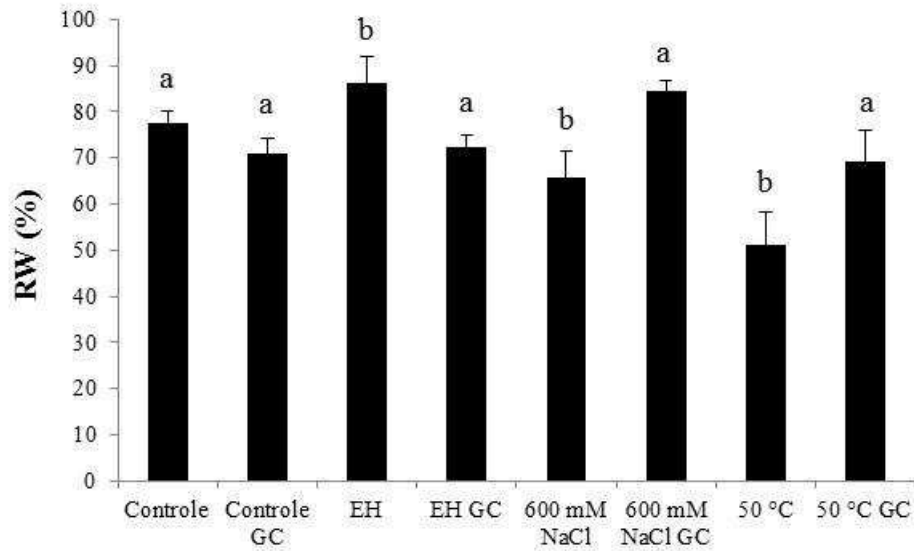


Figura 2. Conteúdo relativo de água em plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes condições de estresse abiótico: **Controle** - plantas não submetidas ao estresse abiótico; **Controle GC** - plantas não submetidas ao estresse abiótico e inoculadas com *G. clarum*; **EH** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega; **EH GC** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega e inoculadas com *G. clarum*; **600 mM NaCl** - plantas submetidas ao estresse salino; **600 mM NaCl GC** - plantas submetidas ao estresse salino e inoculadas com *G. clarum*; **50 °C** - plantas submetidas ao estresse térmico; **50 °C GC** – plantas submetidas ao estresse térmico e inoculadas com *G. clarum*. Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (**Controle**) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

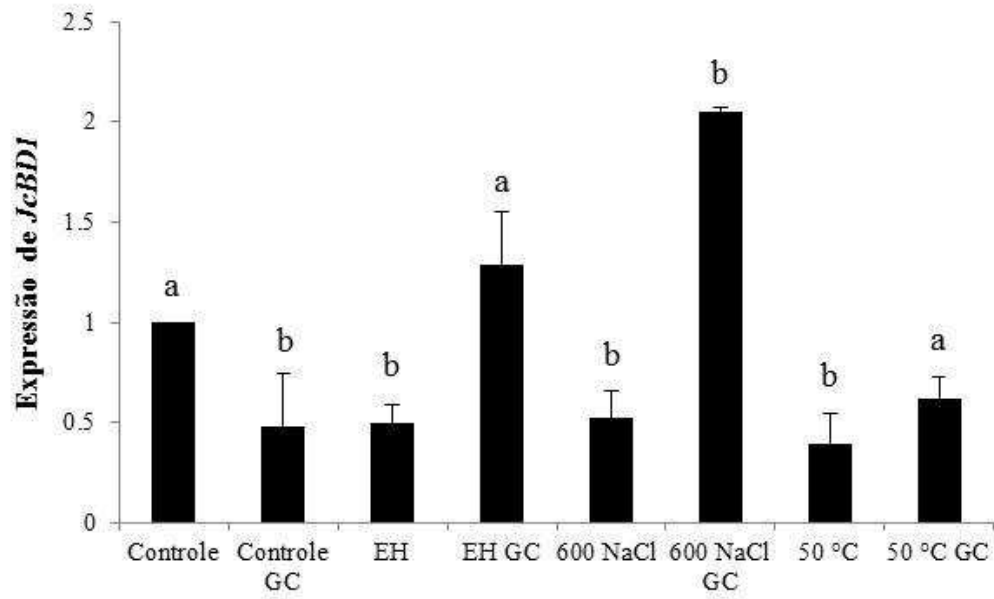


Figura 3. Expressão relativa do gene JcBD1 em plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes condições de estresse abiótico: **Controle** - plantas não submetidas ao estresse abiótico; **Controle GC** - plantas não submetidas ao estresse abiótico e inoculadas com *G. clarum*; **EH** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega; **EH GC** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega e inoculadas com *G. clarum*; **600 mM NaCl** - plantas submetidas ao estresse salino; **600 mM NaCl GC** - plantas submetidas ao estresse salino e inoculadas com *G. clarum*; **50 °C** - plantas submetidas ao estresse salino e inoculadas com *G. clarum*; **50 °C GC** – plantas submetidas ao estresse térmico e inoculadas com *G. clarum*. Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (**Controle**) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.

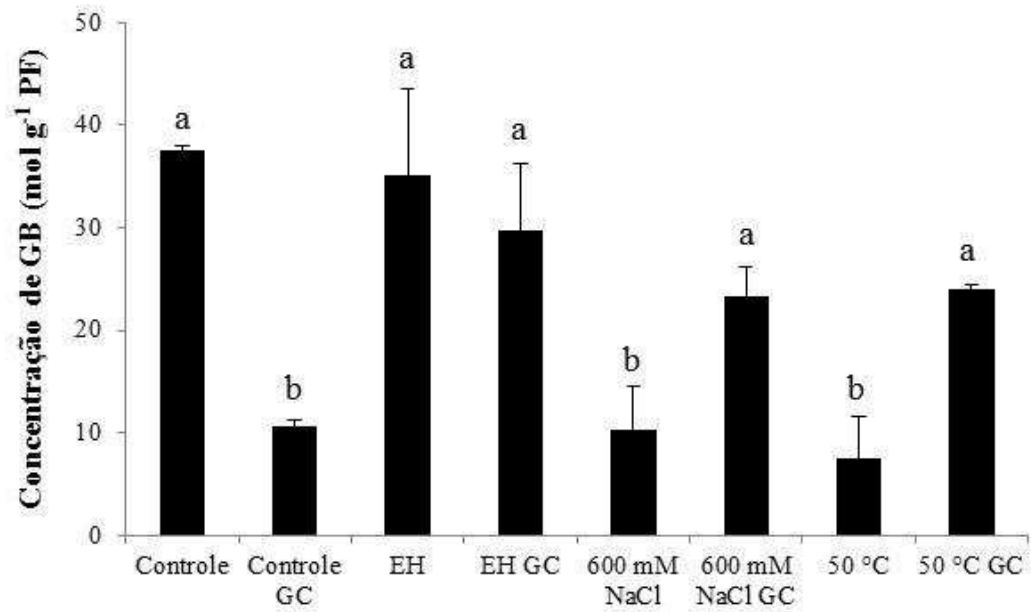


Figura 4. Concentração de GB em plantas de *Jatropha curcas* sob diferentes condições de estresse abiótico: **Controle** - plantas não submetidas ao estresse abiótico; **Controle GC** - plantas não submetidas ao estresse abiótico e inoculadas com *G. clarum*; **EH** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega; **EH GC** - plantas submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega e inoculadas com *G. clarum*; **600 mM NaCl** - plantas submetidas ao estresse salino; **600 mM NaCl GC** - plantas submetidas ao estresse salino e inoculadas com *G. clarum*; **50 °C** - plantas submetidas ao estresse térmico; **50 °C GC** - plantas submetidas ao estresse térmico e inoculadas com *G. clarum*. Barras seguidas de letras iguais, não diferem do tratamento controle (**Controle**) a 5% de probabilidade pelo teste de Dunnett.



Figura 5. (a) Fotomicrografia ótica de estruturas típicas da associação micorrízica arbuscular produzidas em plantas de pinhão-mansó sob diferentes condições de estresse abiótico 60 dias após a inoculação com *G. clarum*. Vesículas (v) e hifas intra radiculares (hi); (b) plantas submetidas ao estresse hídrico, inoculadas (I) ou não (NI) com *G. clarum*; (c) plantas controle (não submetidas ao estresse abiótico), inoculadas (I) ou não (NI) com *G. clarum*; (d) plantas submetidas ao estresse térmico, inoculadas (I) ou não (NI) com *G. clarum*.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo mostram que sob condições de déficit hídrico, a colonização de *J. curcas* por FMAs aumenta a absorção de nutrientes essenciais pelas plantas, alterando a distribuição de biomassa e nutrientes. Estas características aumentam a robustez desta planta às condições de estresse hídrico, uma vez que o baixo índice pluviométrico é uma condição limitante da produção de sementes. FMAs e GB podem assim, amenizar e compensar as limitações de crescimento impostas por condições de déficit hídrico, desempenhando, portanto, um papel essencial na tolerância ao estresse e produção de biomassa em *J. curcas*.

Plantas de pinhão-manso, independente da ação de GB e *G. clarum*, apresentaram alta atividade de enzimas antioxidativas, mesmo quando bem irrigadas, indicando assim, que estas plantas possuem sistema de defesa muito eficiente.

A capacidade de plantas de *J. curcas* modificar suas características morfológicas, fisiológicas, moleculares e estruturais em resposta à seca no fornecimento de recursos hídricos é alterada pela inoculação com FMAs e por GB. A associação micorrízica arbuscular pode ser utilizado como um fator de atenuação das consequências do estresse hídrico em plantas de *J. curcas*.

Sob condições de estresse abiótico, a colonização de *J. curcas* por *G. clarum* aumenta a expressão do gene *JcBD1* envolvido na tolerância ao estresse, com consequente aumento da concentração de GB, melhorando assim, o balanço hídrico nesta espécie.