

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO, FISIOLOGIA E BIOENERGÉTICA DE
PLÂNTULAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) E TRANSGÊNICO
(AVP1OX) INOCULADOS COM MICRO-ORGANISMOS
PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

SÁVIO BASTOS DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2016

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO, FISIOLOGIA E BIOENERGÉTICA DE
PLÂNTULAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) E TRANSGÊNICO
(AVP1OX) INOCULADOS COM MICRO-ORGANISMOS
PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

SÁVIO BASTOS DE SOUZA

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

Orientador: ARNOLDO ROCHA FAÇANHA

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

160/2016

Souza, Sávio Bastos de

Crescimento, nutrição, fisiologia e bioenergética de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.) e transgênico (AVP1OX) inoculados com micro-organismos promotores do crescimento vegetal / Sávio Bastos de Souza. – Campos dos Goytacazes, 2016.

84 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha.

Área de concentração: Fisiologia vegetal.

Bibliografia: f. 57-72.

1. ATPase 2. *Herbaspinillum seropedicae* 3. BPCV 4. FMA 5. AVP1OV I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal II.

Título

CDD 571.2

CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO, FISIOLOGIA E BIOENERGÉTICA DE
PLÂNTULAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) E TRANSGÊNICO
(AVP1OX) INOCULADOS COM MICRO-ORGANISMOS
PROMOTORES DO CRESCIMENTO VEGETAL

SÁVIO BASTOS DE SOUZA

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

Comissão Examinadora

Prof. Leonardo Barros Dobbss (D.Sc., Produção Vegetal) – UFVJM

Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) – UENF

Prof. Lev Alexandrovitch Okorokov (PhD., Bioquímica) – UENF

Prof. Arnaldo Rocha Façanha (D.Sc., Química Biológica) – UENF
(Orientador)

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível.”

Charlie Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que me concede todos os dias.

Aos meus pais, Luciane e José Carlos, por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos. Obrigado pelo amor incondicional e por todos os puxões de orelhas, que diariamente me fazem uma pessoa melhor, amo vocês.

Ao meu irmão Saulo, por sempre estar comigo e me ajudar sempre que precisei. Te amo irmão!

Gostaria de agradecer ao meu Orientador Arnaldo Rocha Façanha, pela oportunidade inicial, e por todo conhecimento e experiência científica que me concedeu.

Gostaria de agradecer imensamente ao meu Co-orientador Alessandro Coutinho Ramos, que desde a iniciação científica vem me dando oportunidades de crescer cada vez mais. Sendo um amigo e um pai nos momentos difíceis e nos momentos de alegria. Muito obrigado!

Agradeço imensamente os meus amigos, que sem eles este trabalho não seria possível. Aos amigos Amanda, Juju, Freddy, Júlia, Antônio, Juliana, Scooby, Brunna, Gil, Janielio e Raul que me ajudaram muito nestes dois anos! Muito obrigado!

Agradeço à Professora Marta Simone e aos Professores Eliemar Campostrini e Fábio Lopes Olivares, pelo efetivo auxílio nos experimentos. Muito obrigado!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação!
MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 - Fertilizantes químicos e o seu impacto no meio ambiente.....	4
2.2 - Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).....	5
2.2.1 - A bactéria endofítica <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	7
2.3 - Papel do Fungo micorrízico arbuscular na absorção de nutrientes do solo.....	9
2.4 – Importância das bombas de H ⁺ para o desenvolvimento vegetal.....	10
3 – OBJETIVOS.....	14
3.1 - Objetivo Geral.....	14
3.2 - Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 - Obtenção das sementes, condições de crescimento e análise dos parâmetros de crescimento das plantas.....	15
4.3 - Determinação da taxa de colonização micorrízica.....	16
4.4 - Trocas gasosas.....	16
4.5 - Isolamento de Membrana.....	17
4.6 - Determinação da atividade H ⁺ -ATPásica e H ⁺ -pirofosfatásica.....	17
4.7 - Monitoramento do Gradiente de H ⁺	18
4.8 - Immunoblotting.....	18
4.9 - Acumulação de Nutrientes na Parte Aérea.....	19
4.10 - Análise Estatística do Dados.....	19
5. - RESULTADOS.....	20
5.1 – Respostas no crescimento de Plantas de Arroz Wild-type ou transgênico pela inoculação com micro-organismos simbiotes.....	20
5.2 – Porcentagem de colonização micorrízica.....	23

5.3 – Acumulação de macronutrientes na parte aérea	24
5.4 – Acumulação de micronutrientes	28
5.5 - Assimilação de Carbono e Eficiência no uso da água.....	32
5.3 – Atividade hidrolítica das ATPases e V-PPase.....	37
5.4 – Velocidade inicial de transporte de prótons	41
5.5 - Análise do Western Blotting.....	43
5.6 – Um comparativo dos genótipos Wild-type e AVP1OX no potencial de estimulação ou inibição dos parâmetros estudados	44
5.7 - Análise multivariada (PCA).....	47
6 - DISCUSSÃO.....	49
7 - CONCLUSÃO	56
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

A utilização de micro-organismos promotores do crescimento vegetal representa uma estratégia indispensável no desenvolvimento de uma agricultura ecológica e economicamente sustentável. O uso de plantas transgênicas com maior capacidade de absorção de nutrientes, também tem se consolidado com uma inegável alternativa, ainda que pouco explorada no que tange interação com micro-organismos rizosféricos promotores do crescimento. O presente estudo objetivou: (I) Caracterizar as respostas nutricionais e Fotossintéticas de plantas de arroz AVP1OX (super-expressando a V-PPase) inoculadas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares; (II) descrever a participação das bombas de H⁺ nos mecanismos de promoção do crescimento recrutados por cada micro-organismo e da sua interação. Plantas AVP1OX apresentaram maior capacidade de assimilação de carbono, eficiência no uso da água e carboxilação, quando comparadas as plantas Wild-type. O que pode ser observado nas plantas Wild-type quando inoculados com os micro-organismos, quando comparados com o controle. Plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* promoveu incrementos significativos nos parâmetros de crescimento e no conteúdo de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S). Plantas AVP1OX, apresentaram diferenças significativas na atividade das V-PPases em relação ao controle, indicando que há um desacoplamento destas Bombas. A atividade da V-ATPase em plantas Wild-type foi significativamente ativada nos tratamentos com Sh, Hs e Sh+Hs, enquanto

plantas AVP10X apresentaram elevada atividade exclusivamente no tratamento com Sh. Em relação à V-PPase, plantas Wild-type e AVP10X apresentaram uma ativação tanto da atividade hidrolítica quanto do transporte de H^+ quando inoculadas com Hs+Sh. Conclui-se que plantas de arroz Wild-type e AVP10X inoculadas com a BPCV apresentam maior promoção do crescimento e maior capacidade de absorção de nutrientes, assim como taxas fotossintéticas. Em nível de membrana celular, tais efeitos estão relacionados a uma modulação diferencial das bombas de H^+ induzidas pela ação dos micro-organismos simbiotes.

ABSTRACT

The use of plant growth promoting microorganisms is an essential strategy for the development of an environmentally and economically sustainable agriculture. The use of transgenic plants with higher capacity to absorb nutrients has also been established with an undeniable alternative, yet little has been explored regarding interaction with rhizosphere microorganisms growth promoters. This study aimed to: (i) characterize the nutritional and photosynthetic responses of AVP1OX rice plants (over-expressing the V-PPase) inoculated with diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungi; (II) describe the participation of H⁺ pumps in promoting growth mechanisms recruited by each microorganism and its interaction. AVP1OX plants have increased carbon assimilation capacity, water usage efficiency and carboxylation, when compared to WT plants. The same can be seen in WT and AVP1OX plants when inoculated with the microorganisms, when compared to their respective controls. Plants inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* promoted significant increases in parameters and content of macronutrients (N, P, K, Ca, Mg and S). AVP1OX plants, showed a significant differences in the activity of V-PPase compared to the control, indicating a decoupling of these pumps. The activity of the V-ATPase in WT plants was significantly activated in treatments with Sh, Sh+Hs and Hs, whilst AVP1OX plants showed high activity on treatment with Sh and Sh+Hs. Regarding the V-PPase, WT and AVP1OX plants have an activation of both hydrolytic and transport activity of H⁺ when inoculated with Hs+Sh. It is concluded

that rice plants WT and AVP1OX inoculated with plant growth promoting bacteria have much greater growth promotion and greater nutrients absorption capacity, as well as photosynthetic rates. At cellular membrane level, such effects are related to differential modulation of H⁺ pumps induced by the action of symbiotic microorganisms.

1. INTRODUÇÃO

As últimas cinco décadas foram marcadas por importantes avanços e mudanças na produção agrícola, desde a revolução verde até a consolidação da biotecnologia moderna (Han, 2015; Glick, 2012).

Estima-se que o planeta abrigará aproximadamente 8 bilhões de pessoas em 2020, o que acarretará num aumento expressivo na demanda por alimentos (ONU, 2008). Assim, para aumentar a produção agrícola, a agricultura convencional tem utilizado intensivamente fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos, além de defensivos agrícolas (Duvick, 2005). De fato, anualmente mais de 170 milhões de toneladas de fertilizantes químicos são aplicados em lavouras (Miransari, 2011), e como consequência, contribui na elevação do custo de produção e na degradação dos recursos naturais, incluindo as interações ecológicas do solo e rizosfera (Shahzad et al., 2013). Nesse contexto, novas tecnologias que otimizem a produtividade vegetal e que não agridam o meio ambiente se fazem necessárias. Além do uso de plantas geneticamente modificadas, uma alternativa ecologicamente sustentável é a utilização de micro-organismos promotores do crescimento vegetal, tais como Bactérias endofíticas e Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) associados às culturas de plantas de interesse agrícola (Arruda et al. 2013; Smith e Read, 2008).

Os micro-organismos promotores do crescimento proporcionam diversos benefícios às plantas hospedeiras (Babalola, 2010), como é o caso da *Herbaspirillum seropediae* que além de fixar nitrogênio, produz fitohormônios e participa do controle direto e indireto de patógenos, favorecendo assim o desenvolvimento da planta hospedeira (Bhattacharyya e Jha, 2012). Semelhante

as bactérias promotoras do crescimento vegetal, os FMAs potencializam a capacidade das plantas em enfrentar estresses abióticos e no controle de possíveis patógenos, auxiliando também na absorção de nutrientes devido a expansão da área de exploração das raízes (Smith e Read, 2008; Ramos et al., 2011). Além disso, foi observado em plantas colonizadas por FMAs um aumento na absorção de nutrientes devido ao incremento da atividade e expressão de H⁺-ATPases de membrana plasmática (Requena et al., 2003; Ramos et al., 2008).

Nesses organismos, a absorção de nutrientes ocorre, via transportadores secundários, os quais necessitam do aporte de energia que é fornecido pelos sistemas de transporte primários (Gaxiola, 2007). Deste modo, as H⁺-ATPases do tipo P e V, e as H⁺-pirofosfatases vacuolares (V-PPases), geram uma força próton-motora que energiza os transportadores secundários (Shavrukov e Hirai, 2015; Sze et al. 1999). Alguns estudos demonstraram que a super-expressão de genes que codificam as bombas de H⁺ podem representar uma importante estratégia para o aumento na produtividade de várias espécies de importância econômica (Park et al., 2005; Gaxiola et al., 2007). Um exemplo, é a super-expressão do gene AVP1 que codifica a V-PPase em plantas, que tem sido relacionada a regulação do transporte de auxina, a promoção do desenvolvimento radicular, tolerância a estresses abióticos e aumento da captação de nutrientes (Li et al. 2005). Curiosamente, plantas transgênicas AVP1OX com super-expressão do gene que codifica a V-PPase, apresentam benefícios semelhantes aos observados na interação com micro-organismos promotores do crescimento. Parece haver uma analogia entre promoção do crescimento por micro-organismos e super-expressão do gene AVP1OX codificando a V-PPase, fato este que pode ajudar a revelar novos aspectos de modulações da bioenergética vegetal que possibilitem a formulação de novos insumos e manejos capazes de aperfeiçoar a agricultura em solos pobres em nutrientes e/ou sob outros estresses ambientais.

A hipótese desse estudo é que os micro-organismos promotores do crescimento modulam as bombas de H⁺ de plantas mimetizando efeitos da transgenia AVP1OX, induzindo ativações sincronicas da V-PPase vacuolar e da H⁺-ATPase da membrana plasmática, estimulando a absorção de nutrientes e promovendo outras alterações fisiológicas adaptativas em relação a diversas condições de estresses. Neste projeto, estudaremos a relação entre micorrizas

arbusculares e BPCV na regulação das bombas de H^+ em plantas de arroz AVP1OX.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Fertilizantes químicos e o seu impacto no meio ambiente

Devido a adoção de novas práticas de cultivos advindas da “Revolução Verde”, o emprego de fertilizantes químicos em cultivos comerciais praticamente quadruplicou entre os anos de 1960 e 2000, entretanto apesar dos benefícios, também vem ocasionando diversos problemas ambientais, tais como a poluição de rios e mananciais, prejudicando a saúde da população e aumentando o custo com a despoluição (Tilman et al., 2002)

Cerca de 176 milhões de toneladas de fertilizantes químicos são aplicados anualmente com o objetivo de melhorar o rendimento de culturas de importância econômica em todo o Globo (Shahzad et al., 2013). No entanto, a elevada utilização destes fertilizantes na agricultura tem ocasionado diversos problemas ao meio ambiente, tais como lixiviação, escoamento superficial, volatilização e eutrofização dos sistemas aquáticos (Vessey, 2003).

. Dentre os principais nutrientes que são aplicados no solo para melhorar a produção agrícola, o nitrogênio desponta como o mais limitante para o rendimento final dos cultivos, principalmente de plantas não leguminosas, sendo necessário a aplicação de grandes quantidades deste nutriente (Grant et al., 2012).

A utilização excessiva de adubação nitrogenada está relacionada aos processos de volatilização, imobilização, desnitrificação, e escoamento superficial (Grant et al., 2012; Miransari, 2011; Ziadi et al., 2013). Além disso, estudos realizados com a produção de cereais indicaram baixa eficiência na utilização dos

fertilizantes nitrogenados, entre 33 e 36% (Ladha et al., 2005; Liang et al., 2013). Atualmente, estima-se que o nitrogênio não utilizado representa uma perda de mais de 90 milhões de dólares anualmente, sendo por isso recomendado ajustar a quantidade de N que será aplicada no solo, evitando desperdícios, além de evitar a poluição desnecessária ao meio ambiente (Liang et al., 2013; Mulvaney et al., 2009; Ziadi et al., 2013). Outro fator é que com o aumento no uso de fertilizantes químicos também houve maior incidência de doenças de folhas em algumas culturas, sendo necessário um maior uso de pesticidas (McLaughlin e Mineau, 1995).

Uma possível alternativa para a redução na utilização de fertilizantes químicos, de forma a suprir os nutrientes necessários para desenvolvimento das plantas e aumentar o rendimento de grãos, é o uso dos micro-organismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) presentes no solo. Dentre eles podemos destacar as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), os quais são comprovadamente vantajosos para otimizar o crescimento e desenvolvimento das plantas através da melhora no status nutricional, produção de fitormônios e proteção destas contra diversas formas de estresse biótico e abiótico (Zamioudis et al., 2013; Castagno et al., 2014; Legay et al., 2016). A utilização destes micro-organismos pode ser uma opção viável para a redução da dependência que hoje a agricultura tem dos fertilizantes químicos, tornando assim estas práticas mais sustentáveis, beneficiando não apenas os sistemas agrícolas, mas também o meio ambiente como um todo (Olivares et al., 2013).

2.2 - Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

A inoculação de plantas por micro-organismos promotores do crescimento vegetal, tais quais as bactérias e fungos, aumentam a performance de plantas há milhões de anos, entretanto por séculos o crescimento destas não era atribuído aos micro-organismos presentes no solo (Bashan et al., 2014). Desde a descoberta dos rizóbios em 1886, por 120 anos, inóculos formados por *Rhizobium* vem sendo comercializados em muitos países, devido aos benefícios promovidos por estes simbioses (Deaker et al., 2004).

Apesar disso o termo bactéria promotora de crescimento vegetal foi utilizada por Kloepper e Schroth apenas em 1979, e desde então o número de pesquisas relacionadas ao entendimento da interação planta-micro-organismos vem aumentando (Babalola, 2010; Vessey, 2003). Apesar de ainda não existir uma definição exata para biofertilizador, este termo refere-se ao uso de micro-organismos com o objetivo de aumentar a disponibilidade e captação de nutrientes minerais pelas plantas (Babalola, 2010; Bhattacharjee et al., 2008; Vessey, 2003).

As BPCV podem ser definidas como um grupo heterogêneo de bactérias de vida livre que ao se associar a rizosfera de plantas podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico, direta e/ou indiretamente (Estrada et al., 2013; Fan et al., 2011). Contribuem diretamente através da fixação do nitrogênio atmosférico; solubilização de compostos minerais como fósforo; produção de sideróforos; produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, tais como auxina, giberelina, citocinina e etileno; e indiretamente através do antagonismo a organismos fitopatogênicos tais como fungos, vírus e nematóides e indução da resistência sistêmica contra doenças (Arruda et al., 2013; Liu, et al., 2013; VanLoon, 2007; Vargas et al., 2012; Vessey, 2003).

Dentre as espécies de BPCV, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea*, como sendo os gêneros que comprovadamente atuam no crescimento diferencial das plantas (Babalola, 2010).

Devido aos efeitos benéficos na produtividade de plantas e por representar uma potencial alternativa para o uso intensivo de fertilizantes químicos e pesticidas nos sistemas agrícolas, têm-se empregado estas bactérias com o objetivo de auxiliar no crescimento e desenvolvimento de culturas de importância econômica (Carvalhais et al., 2013).

2.2.1 - A bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae*

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram encontradas em associação com uma grande variedade de plantas, principalmente membros da família as Poaceae. Elas foram inicialmente isoladas em 1984 a partir da rizosfera de raízes de arroz, milho e sorgo, sendo inicialmente chamada de *Azospirillum seropedicae* (Baldani et al., 1984). Apesar deste grupo de bactérias apresentarem diversas semelhanças ao gênero *Azospirillum*, estudos de homologia entre DNA:DNA demonstraram a descoberta de um novo gênero denominado *Herbaspirillum*, desta forma *Azospirillum seropedicae* foi renomeado para *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986; Baldani, 2005).

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe Betaproteo bactéria e compreende atualmente 14 espécies. Apesar dos micro-organismos pertencentes a este gênero serem mais conhecidos como bactérias associadas a plantas, também pode-se encontrar espécies pertencentes a este gênero em ambientes aquáticos, em solos ou até mesmo em pulmões de pacientes com fibrose cística (Monteiro et al., 2012).

A bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* é conhecida por realizar associação com muitas plantas de interesse econômico, principalmente com membros da família Poacea (gramíneas), como o milho, arroz, sorgo, trigo e cana-de-açúcar (Baldani et al., 1986; James et al., 1997; Olivares et al., 1996). Apesar disso a *H. seropedica* também pode ser encontrada em associação com leguminosas, como por exemplo o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Schmidt et al., 2011) e também com plantas tropicais de importância econômica como a banana e o abacaxi (Cruz et al., 2001).

O processo de colonização das plantas inicia-se quando a bactéria é atraída pelas raízes da planta através do fornecimento de fontes de carbono por meio das raízes, e em seguida ocorre a adesão da bactéria à superfície radicular e subsequente colonização dos pontos de emergência das raízes laterais e penetração através dos pontos de descontinuidades da epiderme radicular, a colonização acontece de forma rápida, podendo ser observada entre 5 e 8 dias após a inoculação (Balsanelli et al., 2010; Monteiro et al., 2012).

Após penetrar nos tecidos das raízes, as células de *H. seropedicae* rapidamente ocupam os espaços intercelulares se alastrando até os tecidos do

xilema, colonizando então outros tecidos e partes da planta, tais como os tecidos do aerênquima de arroz (Gyaneshwar et al., 2002; James & Olivares, 1998). Na Figura 1 é possível visualizar o processo de adesão e colonização da *H. seropedicae* nas raízes, onde os pontos vermelhos representam estas bactérias aderidas ao longo da raiz de uma planta de arroz. Estabelecida a relação entre a bactéria-plantas, esta se dispersa por toda a planta.

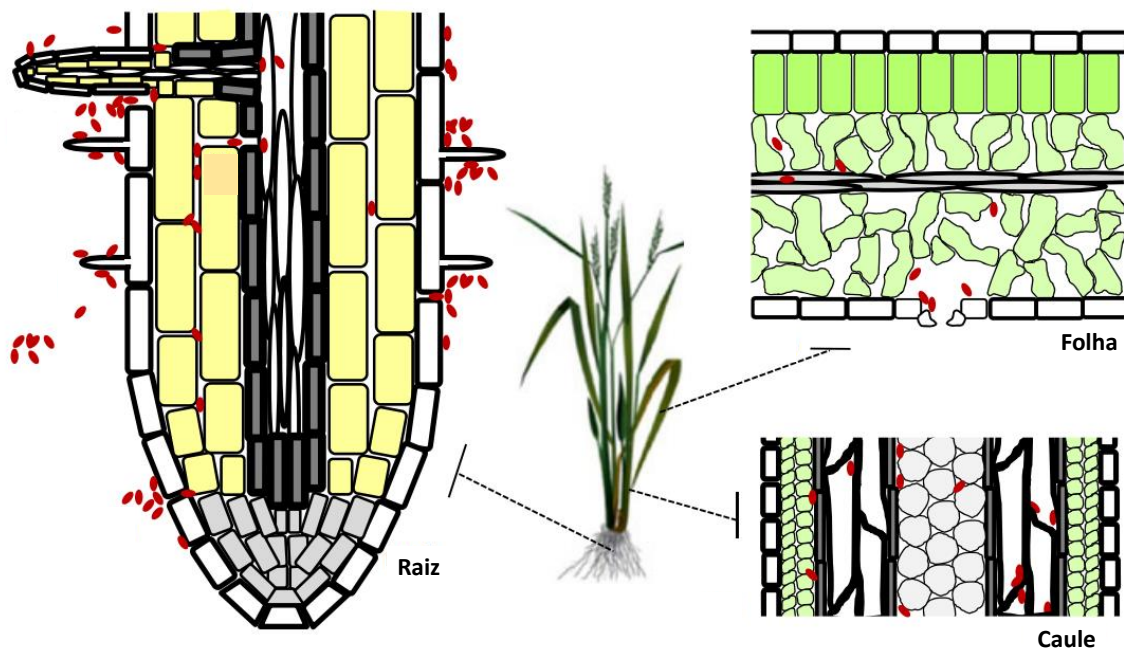


Figura 1: Adesão e colonização de tecidos vegetais por *H. seropedicae* (Monteiro et al., 2012).

Uma vez concretizada a associação entre a bactéria e a planta, *H. seropedicae* pode promover o crescimento diferencial da planta pela produção e suprimento de fatores de crescimento, tais como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, dentre eles auxina, proteção do hospedeiro contra patógenos e produção de sideróforos (Bastian et al., 1998; Balsanelli et al., 2010; Monteiro et al., 2012).

2.3 - Papel do Fungo micorrízico arbuscular na absorção de nutrientes do solo

Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) é a forma mais comum e generalizada de simbiose da planta (Bonneau et al., 2013). A presença dos FMAs, bem como a composição da comunidade e a riqueza de espécies são afetadas por vários fatores, incluindo atributos químicos e físicos do solo, bem como pela fisiologia da planta hospedeira (Leal et al., 2013). Estes fungos são mutualistas obrigatórios incluindo mais de 250 espécies conhecidas pertencentes ao filo Glomeromycota, e gêneros Gigaspora, Scutellospora, Glomus, Acaulospora e Archaeospora (Brundrett e Ashwath, 2013).

O desenvolvimento de simbiose entre os FMAs e as plantas tem sido considerado como uma estratégia de sucesso que permitiu a colonização dos ambientes terrestres pelas plantas no início do processo evolutivo. Tem sido demonstrado pela análise de registros fósseis, que as MAs surgiram a mais de 400 milhões de anos (Reinhardt, 2007; Simith; Read, 2008). O sucesso desta associação é devido aos benefícios existentes para ambas as partes, tanto para a planta quanto para o FMA, onde este aumenta a área de exploração radicular do hospedeiro, devido a expansão do micélio extra radicular, absorvendo nutrientes e água do solo e transferindo estes para a planta, recebendo em troca o C orgânico, que é utilizado em seu desenvolvimento. Toda esta troca existente entre o FMA e a planta é realizada através de uma estrutura especializada do fungo, denominada arbúsculo. Esta estrutura é formada a partir da penetração da parede celular pela hifa, não havendo penetração da membrana plasmática da célula vegetal, aumentando assim a superfície de contato para troca bidirecional entre as partes (Smith e Smith, 2011).

O principal benefício dos FMAs é a maior aquisição de nutrientes , porém vários estudos têm demonstrado que a simbiose pode conferir outros benefícios, como a maior tolerância a micro-organismos patogênicos (Azcón-Aguilar et al., 1996; Gange, 2001), aumento do sucesso reprodutivo e crescimento da planta, maior tolerância a estresses hídricos, altas temperaturas, salinidade e acidez do solo (Cavagnaro et al., 2001; Marulanda et al., 2003; Pocerl et al., 2004; Ruiz-Lozano et al., 2001; Smith et al., 2004; Pozo e Ascon-Aguilar, 2007).

A importância dos FMAs tem se mostrado maiores para a captação e absorção de nutrientes com baixa mobilidade no solo (como o P e Zn), do que para

os nutrientes com maior mobilidade. Entretanto FMAs apresentam a capacidade de absorver N em quantidades até mesmo superiores aos de P, no entanto, acredita-se que a planta não necessita do FMA para sua nutrição nitrogenada, pois seu próprio sistema radicular é capaz de absorvê-lo, visto que apresenta grande mobilidade no solo (Gamper et al., 2004). Todavia existem controvérsias em relação à importância da colonização da planta por FMAs para a absorção de N. Fontes de nitrogênio em sua forma inorgânica e orgânica podem ser efetivamente captadas por FMAs e translocados para a planta hospedeira representando uma rota significativa para a absorção de N pelas plantas (Jin et al. 2012). Embora possa variar de acordo com as condições experimentais e a planta hospedeira, tem sido mostrado que entre 21 e 75% de todo o N absorvido pelas raízes provem do micélio extraradicular de FMAs (Tian et al. 2010). Sabe-se que além do nitrogênio presente no solo, a fixação de N^2 realizado por bactérias é outra importante fonte de nitrogênio para as plantas, existem evidências de que estas bactérias apresentem maior capacidade de fixação de nitrogênio devido ao suprimento de fosfato e micronutrientes providos através das micorrizas, sendo este um efeito indireto da simbiose micorrízica na nutrição de nitrogênio das plantas (Bethlenfalvay, 1992; Smith e Read, 2008).

2.4 – Importância das bombas de H^+ para o desenvolvimento vegetal

Células vegetais que geram grande fluxo de prótons através da membrana plasmática e compartilham importantes características comuns em termos da energética celular. Com relação à estrutura, possuem uma elevada área de superfície para aumentar a interface de absorção, podendo exibir muitas protusões ou invaginações e um grande número de mitocôndrias, encarregadas de aumentar o suprimento de ATP para viabilizar o transporte ativo. Biofisicamente apresentam uma elevada diferença no potencial de membrana, variando entre -150 mV a -200 mV, mantendo a face interna negativa e o exterior ácido, aproximadamente pH 5,5 (Sondergaard et al., 2004).

O fluxo gerado pelas bombas de H^+ contribui de maneira crucial para a manutenção de diversos processos fisiológicos nas plantas. Existem evidências de sua participação no controle do ciclo celular, balanço osmótico, absorção de

nutrientes e expansão celular, via acidificação do apoplasto (Rayle e Cleland, 1992; Kalampanayl e Wimmers, 2001). Dentre estas destaca-se a H⁺-ATPase do tipo P, uma glicoproteína transmembranar, que apresenta importantes funções no desenvolvimento da célula vegetal. Esta proteína hidrolisa ATP gerando um movimento de H⁺ em direção ao apoplasto, que atua como uma força motriz para viabilizar transporte ativo por meio de sistemas secundários que realizam o co-transporte de íons H⁺ acoplado ao transporte de substâncias para dentro e fora da célula (Hu-Cheng et al., 2003).

No vacúolo a H⁺-ATPase (V-ATPase) e a H⁺-pirofosfatase (V-PPase) geram o gradiente transmembranar do tonoplasto. Em hifas de FMAs, o aumento na absorção de fosfato é via incremento na expressão (Requena et al., 2003), e na atividade das H⁺-ATPases (Ramos et al., 2005), e no efluxo de H⁺ e atividade de fosfatases ácidas (Ramos et al., 2008). Estudos citoquímicos têm mostrado que, na simbiose micorrízica arbuscular, um movimento bidirecional de íons opera na interface fungo-planta, sugerindo a presença de sistemas especializados de transporte ativo na membrana periarbuscular (Marx et al., 1982; Gianinazzi-Pearson et al., 1991; Gianinazzi-Pearson, 1996). Sabe-se também que as H⁺-ATPases de células vegetais em contato direto com bactérias fixadoras de nitrogênio geram gradientes eletroquímicos que coordenam e facilitam o movimento de malato e amônio entre a planta e o bacterióide (Day et al., 1995).

No tonoplasto, a V-PPase é funcional na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, atuando também no controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a P-ATPase (Gaxiola et al., 2007). É conhecido que a acumulação de elevadas concentrações de PPI no citosol, inibe as reações de polimerização. Assim, a V-PPase vacuolar recolhe o PPI no citosol e o usa como fonte de energia para o transporte de prótons em vacúolos em expansão (Maeshima, 2000). Sabe-se que o nível de V-PPase em plantas é regulado sobre condições de estresse. Kasai et al. (1998), examinaram o efeito de nutrientes mineirais, como K⁺, NO₃⁻ e Ca²⁺ sobre a V-PPase em raízes de centeio. Tanto a hidrólise de PPI como o gradiente de transporte de prótons, em plantas crescidas em deficiência mineral, foram três vezes maiores do que as plantas crescidas em condições normais.

Rea e Poole (1993), apontaram a importância da V-PPase nas células de plantas sobre estresse de anóxia e baixas temperaturas, o que foi confirmado por

Carystinos et al. (1995) e Davies et al. (1997), que relataram a possibilidade da V-PPase em substituir a V-ATPase em condições de estresse energético, na manutenção da acidez no vacúolo. A super-expressão da H⁺-pirofosfatase (H⁺PPase), gene AVP1OX, em *Arabidopsis thaliana* resultou no aumento de divisões celulares no início da formação do organismo, hiperplasia (aumento do número celular), e elevou o transporte de auxina (Li et al., 2005). Segundo Gaxiola et al. (2007), mudanças na expressão do AVP1OX afetam a abundância e a atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática, alterando o pH do apoplasto e o transporte de auxina em plantas. Testes realizados com *A. thaliana*, resultaram no aumento da tolerância a sal devido a maior absorção e acumulação de íons de Na⁺ em seus vacúolos e conseqüentemente, uma maior capacidade osmorregulatória. Além disso, as plantas AVP1OX revelaram a sua habilidade de resistir à escassez devido, obviamente, a uma dramática expansão do desenvolvimento radicular, recentemente resultados semelhantes foram observados por Li et al., (2015), em plantas de trigo super-expressando a H⁺-Pirofosfatase vacuolar de *Salicornia europaea*, quando estas plantas foram expostas baixos níveis de N.

Park et al.(2005), realizaram estudos sobre a super-expressão da V-PPase vacuolar AVP1OX em arroz, visando a agricultura. Determinações da atividade hidrolítica da V-PPase do tonoplasto de raízes de duas linhagens representativas XAVP1D e plantas controles, mostraram que os mutantes tiveram em média 56% de aumento de sua atividade em relação às plantas controles, enquanto a ATPase do tipo V, não sofreu modificações significativas, quando estas plantas foram expostas ao estresse hídrico, apresentaram crescimento superior que as plantas controle.

Ramos et al. (2005), realizaram estudos associando a atividade ATPásica e Pirofosfatásica com inoculação de fungos micorrízicos (*Glomus clarum* e *Gigaspora margarita*) em raízes de milho. Observaram que as raízes de milho, potencialmente colonizadas, tiveram atividade ATPásica e pirofosfatásica estatisticamente superior ao do tratamento não inoculado. Sendo assim, pode ser feita analogia entre micorrização e plantas transgênicas AVP1OX (H⁺PPase superexpressada), pois ambas causam efeitos semelhantes nos indivíduos. Dados moleculares relataram anteriormente a mesma capacidade do fungo micorrízico arbuscular de induzir a expressão do gene da H⁺-ATPase da membrana plasmática na planta hospedeira

tal como nas plantas transgênicas AVP1OX (Murphy et al., 1996; Ferrol et al., 2000; Krajinski et al., 2002).

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

- Investigar o papel dos micro-organismos simbiotes isolados ou em conjunto na eficiência da promoção do crescimento vegetal, através dos parâmetros nutricionais, fisiológicos e bioquímicos de plantas de arroz Wild-type e transgênicas super-expressando a V-PPase, visando novas estratégias para o aumento da produtividade de culturas de interesse econômico.

3.2 - Objetivos Específicos

- Analisar o acúmulo de nutrientes da parte aérea de plantas de arroz AVP1OX e tipo Wild-type, inoculadas ou não, com os micro-organismos promotores do crescimento;

- Verificar a influência dos com micro-organismos promotores do crescimento em raízes de plantas de arroz AVP1OX e Wild-type sobre a atividade, expressão e transporte das bombas de prótons de membrana plasmática e vacúolo (P-ATPase, V-ATPase e V-PPases).

- Análise multivariada dos dados obtidos para discriminar o conjunto de variáveis que mais explicam a promoção no crescimento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Obtenção das sementes, condições de crescimento e análise dos parâmetros de crescimento das plantas

As sementes de arroz AVP1OX foram obtidas da Universidade do Arizona, Estados Unidos, através do Professor Roberto Gaxiola. As sementes foram inicialmente desinfestadas em álcool 70% por 3 minutos e posteriormente em hipoclorito 2% por 5 minutos, lavadas em água destilada, e transferidas para vasos contendo areia estéril. Para a esterilização da areia foram feitas duas autoclavagens de uma hora, com intervalo de 24 horas entre uma e outra. Após o plantio, as sementes foram levadas para a câmara de crescimento, e 15 dias após a germinação, foram transplantadas para vasos de 1L e inoculadas com os respectivos micro-organismos. O substrato dos vasos foi composto por uma mistura de areia e latossolo vermelho-amarelo distrófico (3:1), cujo processo de esterilização seguiu o mesmo protocolo da areia utilizada na germinação. Para avaliação dos parâmetros de crescimento, foram coletados aleatoriamente quatro plantas por tratamento aos 90 dias após a inoculação, avaliando-se a altura, diâmetro do colo e matéria seca da parte aérea.

4.2 - Material biológico: inóculo do fungo micorrízico arbuscular e isolados bacterianos e inoculação das plantas de *Oryza sativa*

Os esporos de *Scutellospora heterogama* foram obtidos da Coleção Internacional de cultura de Glomeromycota (CICG) da Fundação Universidade Regional de Blumenau. As estirpes da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM10, com a inserção do gene GFP por transposon Tn5 utilizadas, foram obtidas através Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil.

O processo de inoculação das plantas de arroz (*Oryza sativa*), Wild-type e AVP1OX, com o FMA e com as bactérias endofíticas seguiu os protocolos descritos por Boyer et al. (2014) e Baldotto et al. (2011) respectivamente.

4.3 - Determinação da taxa de colonização micorrízica

Após 90 dias de inoculação, foi avaliada a colonização micorrízica nos diferentes tratamentos, conforme descrito por Koske & Gemma (1995) e Grace & Stribley (1991). A percentagem do comprimento de raízes colonizadas foi avaliada pelo método da intersecção em placa quadriculada (Giovanetti & Mosse, 1980).

4.4 - Trocas gasosas

Para as medidas de trocas gasosas foi utilizado um analisador de CO₂ no infravermelho IRGA portátil, de circuito aberto, modelo CIRAS-2 (Portable Photosynthesis Systems, Hitchin, Hertfordshire, UK - LCA). 4 folhas de cada genótipo foram clipeadas com o auxílio de uma cuveta Parkinson com 2,5 cm² de área foliar conectada ao CIRAS-2. Luz artificial saturante, umidade e concentração de CO₂ foram ajustadas para 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de fótons, 80% e 375 ppm, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram avaliados: taxa de transpiração (E: $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs: $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), carbono interno (Ci: ppm) e taxa fotossintética (A: $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.5 - Isolamento de Membrana

A preparação da fração microssomal de raízes de arroz foi realizada através do método de centrifugação diferencial (Giannini e Briskin, 1987). O material biológico foi pesado e homogeneizado em meio tamponado usando almofariz e pistilo. O tampão de extração foi composto de sacarose 250 mM, glicerol a 10 %, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, PVP-40 0,4 %, KCl 100 mM, BSA 0,3 %, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM, na relação peso de tecido/volume de tampão de 1:2. Toda a manipulação foi realizada na temperatura entre 0 e 4°C. O homogenato resultante foi então filtrado e submetido à centrifugação a 300.000 rpm, durante quinze minutos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação a 100.000 g, por 45 min. O precipitado dessa última centrifugação foi solubilizado em solução-tampão com glicerol a 15 %, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, HEPES-KOH 10 mM pH 7,6 e EDTA 1 mM. As amostras foram armazenadas em tubos criogênicos em freezer a -70°C até as análises das atividades ATPásicas. A dosagem de proteína contida na preparação foi dosada pelo método descrito por Bradford (1976).

4.6 - Determinação da atividade H⁺-ATPásica e H⁺-pirofosfatásica

A atividade ATPásica e pirofosfatásica foi determinada colorimetricamente, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada com a adição da proteína e finalizada com a adição de ácido tricloroacético em uma concentração final de 10 % (v/v) após 50 minutos de reação. O meio de reação foi composto por: HEPES-Tris pH 6,5 (membrana plasmática) ou 7,0 (membranas vacuolares) 50 mM, MgSO₄ 3 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM ou PPI 1 mM e 30 µg de proteína. Foram utilizados também inibidores específicos, como o ortovanadato de sódio 0,2 mM (inibidor da ATPase tipo P) e a concanamicina A 5 nM (inibidor da ATPase tipo V). A hidrólise de PPI foi aferida através de sua dependência por K⁺.

4.7 - Monitoramento do Gradiente de H⁺

O gradiente de prótons foi medido como descrito por Michelis e Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha e de Meis (1998), através do monitoramento da taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro. O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado, este tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Logo, a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas. O meio reacional foi composto de Tris pH 6,5 ou 7,0 10 mM, KCl 100 mM, ACMA 1,3 μM , MgSO₄ 3 mM, ATP 1 mM ou PPI 1 mM e 30 μg de proteína. O gradiente foi dissipado com NH₄Cl 1,5 mM.

4.8 - Immunoblotting

Foram aplicadas 10 μg da fração microsomal extraídas de raízes de arroz em gel de SDS 10%. Após a eletroforese, foi feita a transferência para uma membrana de nitrocelulose umedecida no tampão de transferência contendo tampão de corrida sem SDS, 70 mL H₂O e metanol. Após a transferência, a membrana foi deixada sob agitação em solução contendo solução de leite comercial a 5% por 1 hora. Foram utilizados anticorpos contra a P-H⁺-ATPases. O anticorpo primário foi diluído 1:1000 em solução de leite comercial a 3% e incubados sob agitação por 30 minutos; após esse período a placa com a membrana foi incubada a 4 °C “overnight”. Na etapa seguinte a membrana foi lavada com leite 5% por mais 1 hora em agitação trocando a solução a cada 15 minutos. O segundo anticorpo conjugado à peroxidase foi diluído 1:1000 em solução de leite a 5% e incubado por 1 hora em agitação. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com solução de leite 5% em PBS por 3x a cada 10 minutos sob agitação. Em seguida, a banda foi revelada em solução reveladora contendo H₂O, Tris HCl 1 M pH 7,5, DAB, imidazol e 30% de peróxido de

hidrogênio. A membrana foi então descorada em uma placa contendo H₂O, o sinal da ligação específica do anticorpo foi revelado e a imunoresposta detectada pelo programa ImageJ (Wayen Rasband, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.9 - Acumulação de Nutrientes na Parte Aérea

Aos 90 dias após o início dos tratamentos foi realizada a coleta da parte aérea das plantas de arroz Wild-type e AVP1OX, para avaliação dos teores nutricionais. Inicialmente as plantas foram submetidas à secagem, em seguida foram moídas em moinho do tipo Willey e então acondicionado em frascos hermeticamente fechados e identificados.

Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica, no qual o nitrogênio foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Os outros nutrientes P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo e Ni foram quantificados por ICP-OES, após digestão com HNO₃ concentrado e H₂O₂ em sistema de digestão aberta. Condições do ICP: gás plasma 8,0 L min⁻¹, gás a auxiliar 0,70 L min⁻¹ e gás carreador 0,55 L min⁻¹ (Peters, 2005).

4.10 - Análise Estatística do Dados

Os experimentos foram realizados no delineamento experimental de blocos casualizados constando de dois genótipos (Wild-type e AVP1OX) e quatro tratamentos microbiológicos (Controle não inoculado, +Sh, +Hs, +Sh+Hs) com 4 repetições cada. Os dados de todas as análises foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), e a diferença entre os tratamentos foi avaliada através do teste de Tukey, a um nível de 5% de probabilidade.

5. - RESULTADOS

5.1 – Respostas no crescimento de Plantas de Arroz Wild-type ou transgênico pela inoculação com micro-organismos simbiotes

Plantas de arroz inoculadas com a *H. seropedicae* apresentaram um incremento significativo ($P \leq 0.0001$) em todos os parâmetros de crescimento analisados (altura, peso da massa seca e diâmetro da base do caule) em ambos genótipos Wild-type e com super-expressão da V-PPase (AVP1OX) (Figura 2). Por outro lado, a inoculação das plantas com *S. heterogama* não induziu mudanças significativas nos parâmetros analisados ($p=0,2283$).

Em ambos genótipos, a co-inoculação de *H. seropedicae* e *S. heterogama* (Sh+Hs) e a inoculação com *H. seropedicae* não apresentaram diferenças significativas ($p=0,9824$), sugerindo que o efeito no aumento no crescimento é devido à bactéria endofítica e não ao fungo micorrízico (Figura 2). Verificamos também que a inoculação dos genótipos com micro-organismos simbiotes foi responsável por mais de 88% da variância total, e que não houve interação significativa entre os fatores “inoculação” e “genótipos” (Tabela 1).

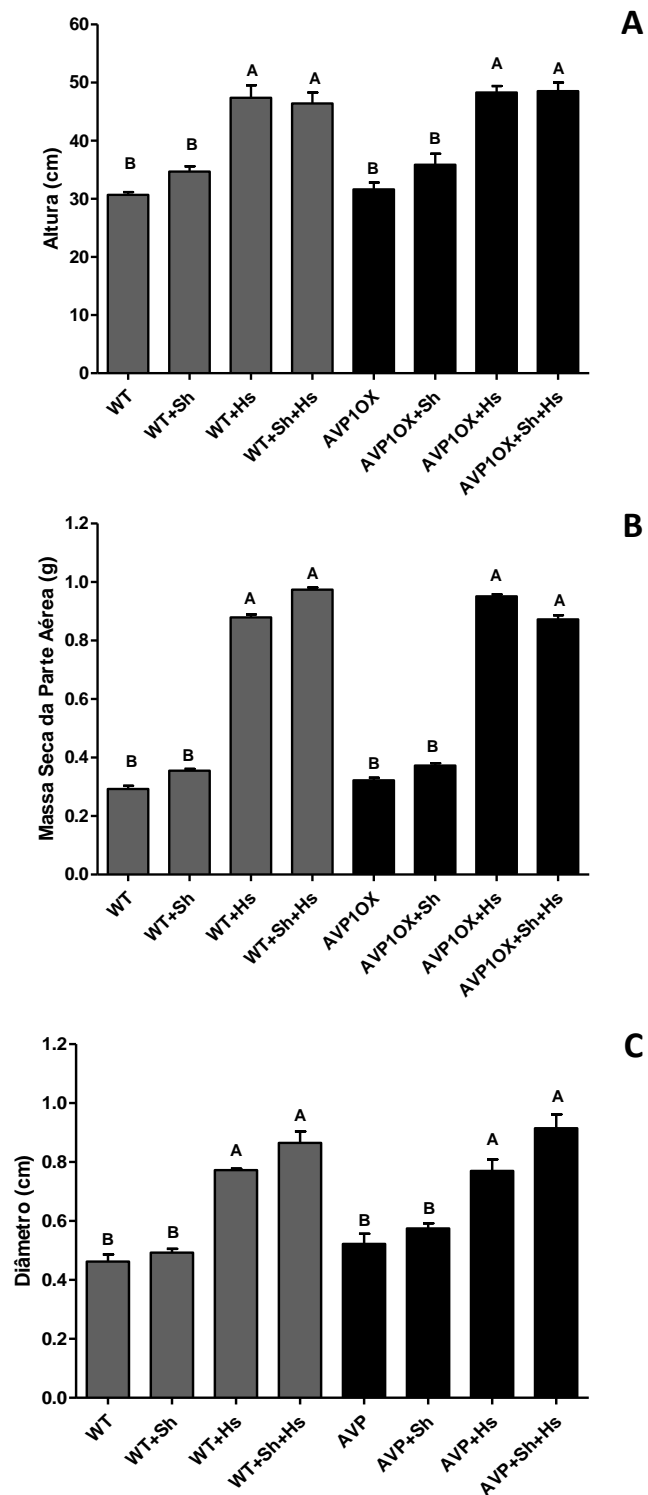


Figura 2. Avaliação dos parâmetros de crescimento: Altura (A), Peso da Matéria Seca de Parte Aérea (B) e diâmetro da base (C) de plantas de arroz super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre *Scutellospora heterogama* (Sh) e *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 1: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com micro-organismos (Sh, Hs, Sh+Hs) nos parâmetros de crescimento de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. *** $p < 0.001$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficientes	GL	SQ	QM	F
a) Altura				
Genótipo	1	13,39	13,39	1,528
Inoculação	3	1738	579,3	66,12***
Genótipo x Inoculação	3	2,041	0,6803	0,07765
Resíduo	24	210,3	8,761	
b) Diâmetro				
Genótipo	1	0,01805	0,01805	4,857
Inoculação	3	0,8697	0,2899	78,00***
Genótipo x Inoculação	3	0,007775	0,002592	0,6973
Resíduo	24	0,0892	0,003717	
c) Massa Seca				
Genótipo	1	0,002655	0,002655	5,658
Inoculação	3	2,773	0,9243	1969***
Genótipo x Inoculação	3	0,01441	0,004805	10,24
Resíduo	24	0,01126	0,0004693	

5.2 – Porcentagem de colonização micorrízica

A porcentagem de colonização das raízes de arroz pelo fungo micorrízico *S. heterogama*, aos 90 dias após a inoculação, não apresentou diferenças significativas entre os genótipos (Figura 3). Uma redução significativa na colonização micorrízica foi observada em plantas AVP1OX quando co-inoculadas com *H. seropedicae* (Figura 3). A média de colonização micorrízica em todos os tratamentos foi de 62,55%.

Raízes de plantas Wild-type e AVP1OX sem inoculação de *Scutellospora heterogama* não apresentaram valores de colonização micorrízica consideráveis.

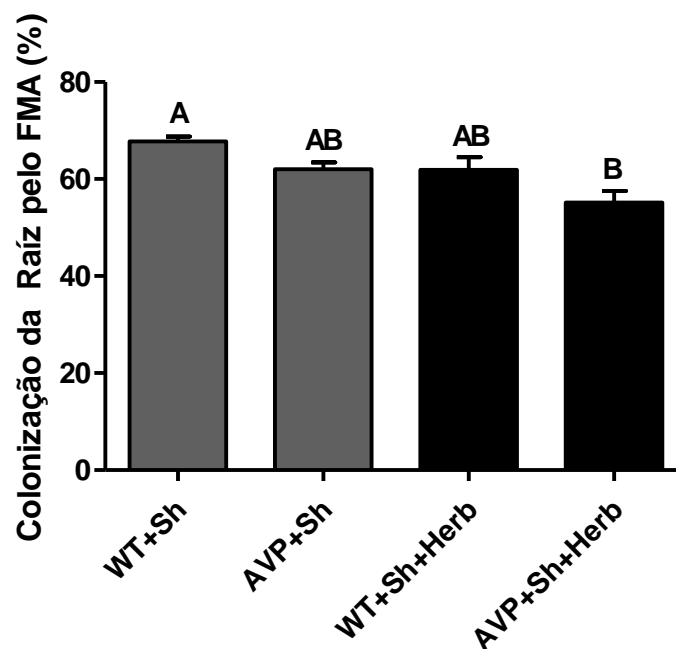


Figura 3. Porcentagem de colonização micorrízica em plantas arroz super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre *Scutellospora heterogama* (Sh) e *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

5.3 – Acumulação de macronutrientes na parte aérea

No presente trabalho foram analisados a acumulação de Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S) (Figura 4).

Os resultados revelaram que plantas Wild-type e AVP1OX, quando não inoculados com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, não apresentaram diferença significativa em todos os seis macronutrientes analisados (Figura 4). Por outro lado, plantas inoculadas com *S. heterogama* (WT+Sh e AVP1OX+Sh) não apresentaram conteúdo macronutrientes diferente dos observados em plantas não inoculadas, exceto para o conteúdo de P (Figura 4).

Os genótipos de arroz (Wild-type e AVP1OX) inoculados com a *H. seropedicae* ou co-inoculadas com o fungo micorrízico, apresentaram elevados conteúdos de K, Ca, Mg e S quando comparados com seus respectivos controles (Figura 4 C, 5 A, B, C). Entretanto, os conteúdos de N e P em plantas AVP1OX inoculadas com *H. seropedicae* e/ou co-inoculadas foram inferiores aos observados em plantas Wild-type com inoculação individual (Figura 4A e B). Com exceção do Mg, os efeitos nos macronutrientes analisados teve o fator “inoculação” dos micro-organismos como responsável por 92% da variância total. No conteúdo de Mg foi possível observar que houve interação entre os fatores “genótipo” e a “inoculação”, entretanto, o fator “inoculação” foi responsável por mais de 60% da variância total (Tabela 2).

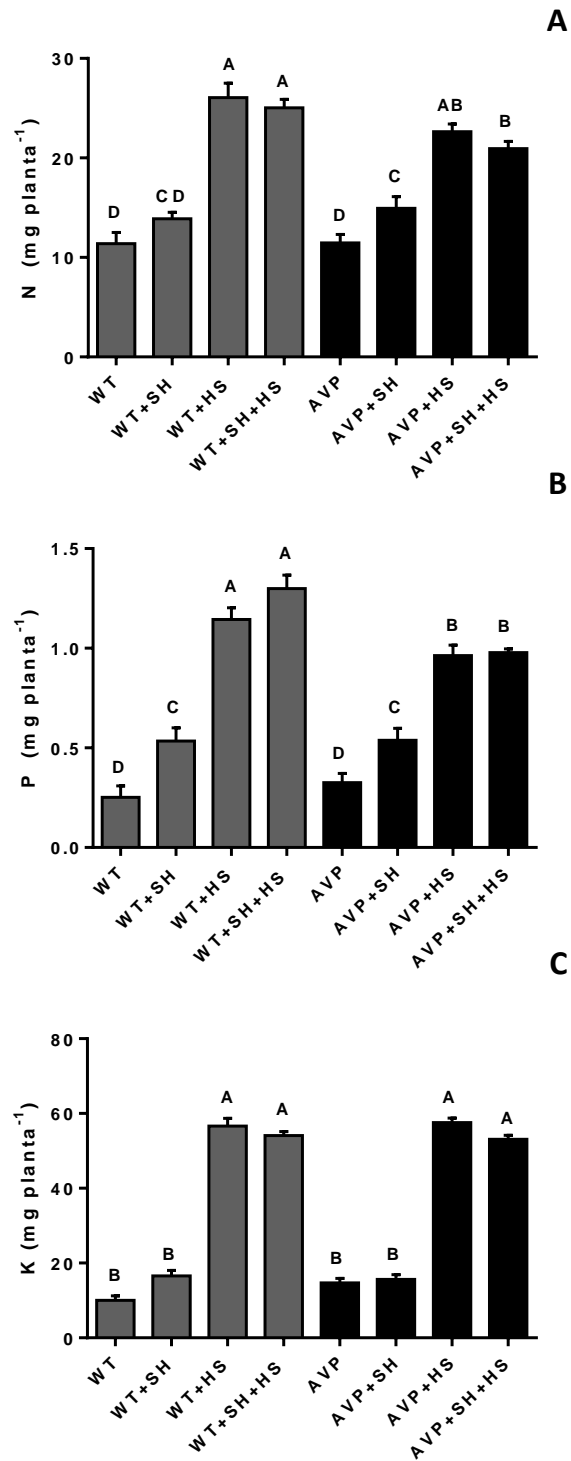


Figura 4. Conteúdo de N, P e K na Parte Aérea de plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

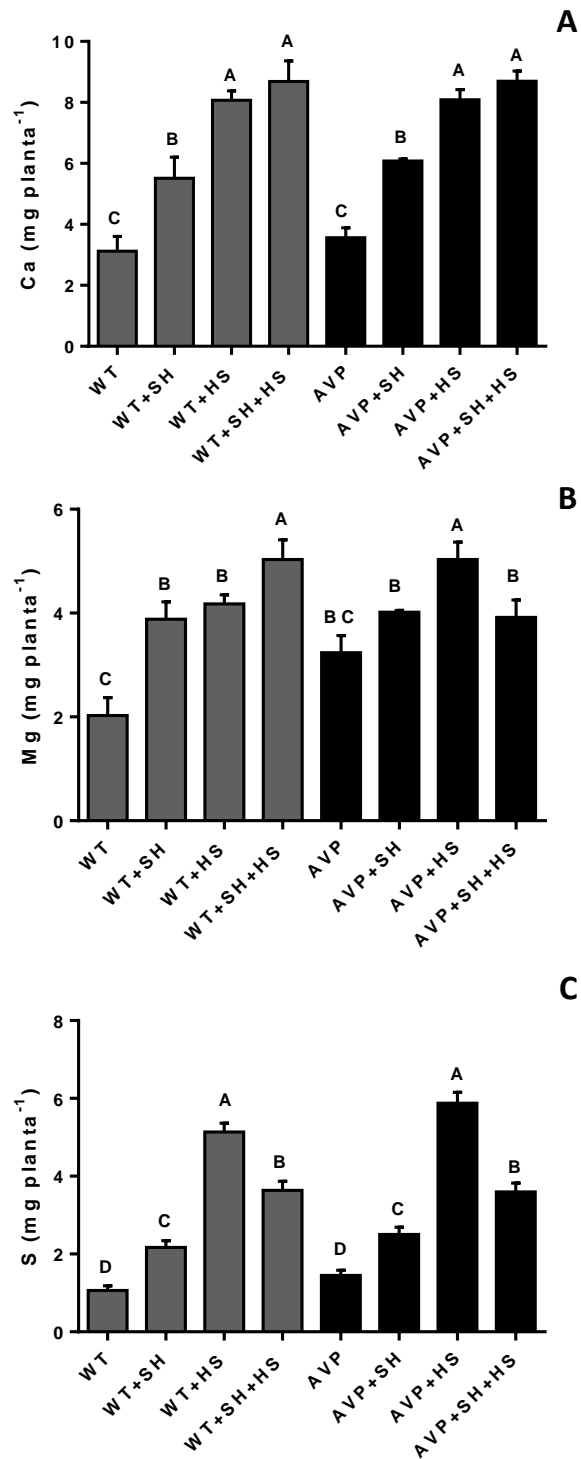


Figura 5. Conteúdo de Ca, Mg e S na Parte Aérea de plantas de arroz superexpressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com micro-organismos (Sh, Hs, Sh+Hs) no conteúdo de macronutrientes de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. *** $p < 0.001$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficientes	GL	SQ	QM	F
a) Ca				
Genótipo	1	0,4012	0,4012	0.6714
Inoculação	3	106,7	35,57	59.53***
Genótipo x Inoculação	3	0,3684	0,1228	0.2055
Resíduo	16	9,560	0,5975	
b) Mg				
Genótipo	1	0,4433	0,4433	1.591
Inoculação	3	14,59	4,862	17.46***
Genótipo x Inoculação	3	4,750	1,583	5.684
Resíduo	16	4,457	0,2786	
c) N				
Genótipo	1	29,12	15,36	5.261
Inoculação	3	726,4	242,1	82.91***
Genótipo x Inoculação	3	29,12	9,706	3.323
Resíduo	16	46,73	2,920	
d) P				
Genótipo	1	0,06755	0,06755	5.249
Inoculação	3	3,011	1,004	109.2***
Genótipo x Inoculação	3	0,1448	0,04826	5.249
Resíduo	16	0,1471	0,009195	
e) S				
Genótipo	1	0,7478	0,7478	5.970
Inoculação	3	60,02	20,01	159.7***
Genótipo x Inoculação	3	0,4582	0,1527	1.219
Resíduo	8	2,004	0,1253	
f) K				
Genótipo	1	4,787	4,787	0.8750
Inoculação	3	10223	3408	622.9***
Genótipo x Inoculação	3	32,04	10,68	1.952
Resíduo	16	87,53	5,470	

5.4 – Acumulação de micronutrientes

Plantas Wild-type e transgênicas super-expressando a V-PPase (AVP1OX), não inoculadas com micro-organismos, não apresentaram diferença significativa com relação ao conteúdo de B ($p=0,9609$), Cu ($p=0,1249$), Mn ($0,9974$) e Ni ($p=0,4639$) (Figura 6 e 7). Entretanto, o conteúdo Zn, Fe e Mo na Parte Aérea foi significativamente maior em plantas AVP1OX ($p\leq 0,001$; Figura 7) quando comparado com as plantas Wild-type.

Plantas Wild-type apresentaram maiores conteúdos de Cu, Ni e Zn quando estas foram inoculadas *H. seropedicae* ($p\leq 0,001$; Figura 6B, 7A,C). Resultados semelhantes foram encontrados nas plantas AVP1OX para estes mesmos micronutrientes.

Os conteúdos de B e Cu em plantas Wild-type foram significativamente maiores quando inoculadas com *S. heterogama* ($p\leq 0,001$; Figura 6A, B). O conteúdo de Cu e Fe em plantas AVP1OX foram maiores quando inoculadas com *H. seropedicae* (Figura 7D) e apenas o conteúdo de Mn apresentou significativos incrementos em ambas as plantas Wild-type e AVP1OX, quando inoculadas com *S. heterogama* (Figura 6D).

A inoculação com *S. heterogama* em plantas AVP1OX não induziram efeitos significativos na acumulação de B quando comparado ao controle não inoculado ($p=0,8012$; Figura 6A) ao passo que a concentração de Fe foi significativamente menor em plantas AVP1OX inoculadas com *S. heterogama* e co-inoculadas com *H. seropedicae* e *S. heterogama* ($p\leq 0,0001$; Figura 7D). Em relação ao Mo, a co-inoculação promoveu um incremento no conteúdo deste micronutriente nas plantas AVP1OX ($p\leq 0,0001$). Os fatores “inoculação”, “genótipos” e a interação “genótipo x inoculação” influenciaram significativamente na variância total de micronutrientes (Tabela 3).

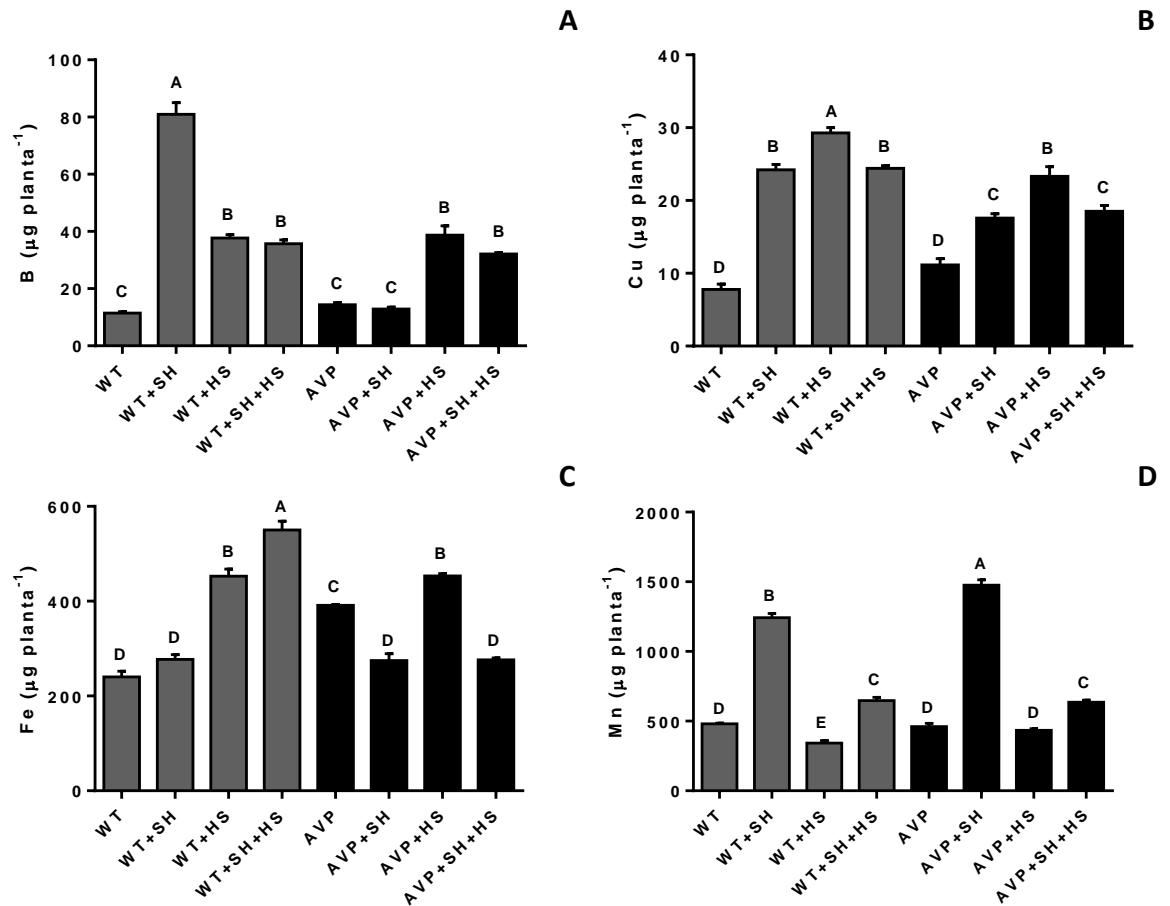


Figura 6. Conteúdo de B, Cu, Fe e Mn na Parte Aérea de Plantas de *Oryza sativa*, super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-Ppase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

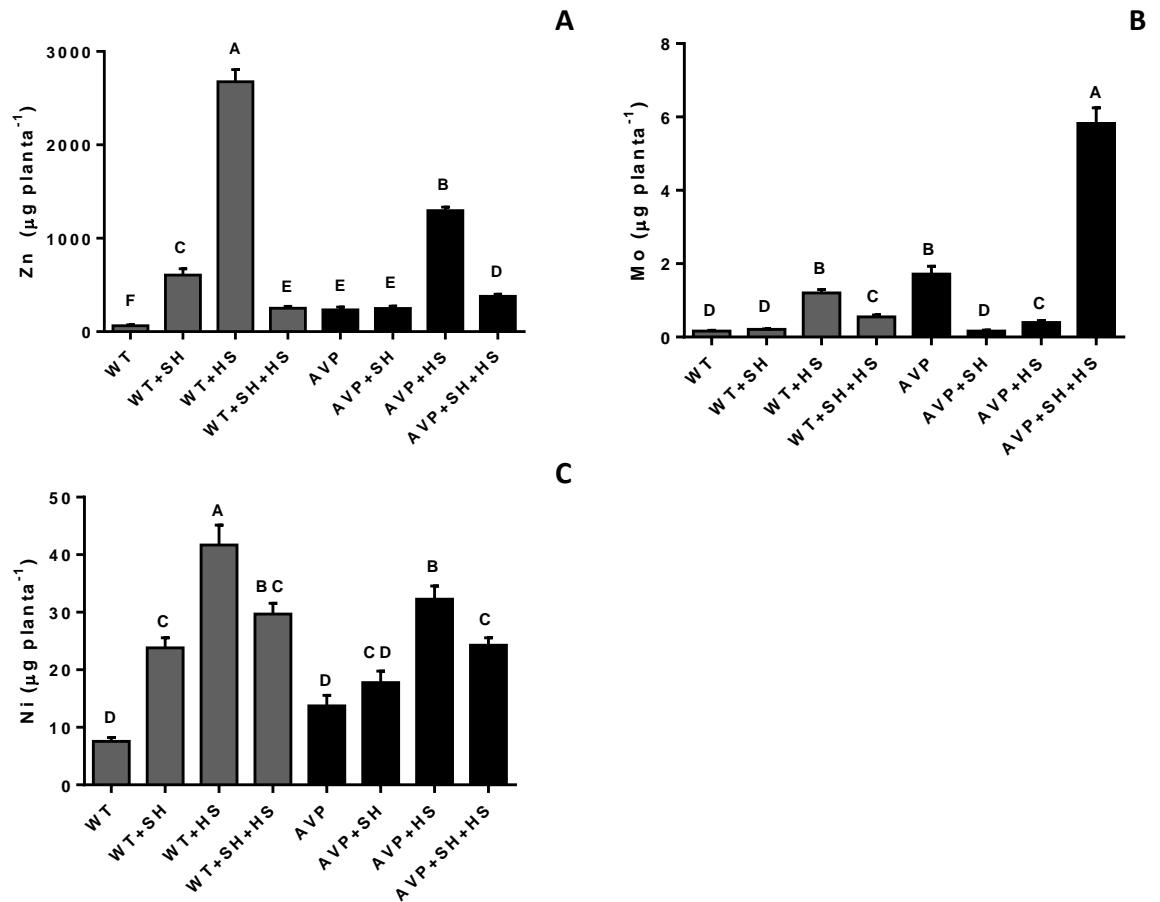


Figura 7. Conteúdo de Zn, Mo e Ni na Parte Aérea de Plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=3).

Tabela 3: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com micro-organismos (Sh, Hs, Sh+Hs) no conteúdo de micronutrientes de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. *** $p < 0.001$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficientes	GL	SQ	QM	F
a) Cu				
Genótipo	1	85,55	85,55	43.57***
Inoculação	3	917,1	305,7	155.7***
Genótipo x Inoculação	3	103,0	34,32	17,48***
Resíduo	16	31,42	1,964	
b) Fe				
Genótipo	1	5820	5820	14.57
Inoculação	3	122530	40843	102.3***
Genótipo x Inoculação	3	140872	46957	117,6***
Resíduo	16	6391	399,4	
c) Mn				
Genótipo	1	32235	32235	20.24
Inoculação	3	3,520e+006	1,173e+006	736.5***
Genótipo x Inoculação	3	63551	21184	13.30
Resíduo	16	25489	1593	
d) Zn				
Genótipo	1	777302	777302	82.94***
Inoculação	3	1,308e+007	4,359e+006	465.1***
Genótipo x Inoculação	3	2,338e+006	779468	83.17***
Resíduo	16	149954	9372	
e) Mo				
Genótipo	1	8,924	8,924	145.5***
Inoculação	3	20,66	6,886	112.2***
Genótipo x Inoculação	3	21,95	7,317	119.3***
Resíduo	16	0,4908	0,06135	
f) Ni				
Genótipo	1	54,43	54,43	6.579
Inoculação	3	1464	488,0	58.98***
Genótipo x Inoculação	3	138,2	46,08	5.570
Resíduo	16	66,18	8,273	
g) B				
Genótipo	1	1726	1726	146.6***
Inoculação	3	3753	1251	106.3***
Genótipo x Inoculação	3	5263	1754	149.0***
Resíduo	16	0,4908	0,06135	

5.5 - Assimilação de Carbono e Eficiência no uso da água

Na parte ecofisiológica foram analisados os parâmetros de capacidade de Assimilação de Carbono (A); Condutância Estomática (g_s); Concentração interna de Carbono (C_i); Eficiência intrínseco do Uso da água ($iWUE$); Eficiência na Carboxilação (A/C_i) e transpiração (E) (Figura 7).

Em todos os parâmetros estudados, plantas de arroz Wild-type inoculadas com *Scutellospora heterogama* e *Herbaspirillum seropedicae*, ou na co-inoculação, apresentaram significativas alterações quando comparadas ao controle não inoculado.

Plantas AVP1OX apresentaram valores médios significativamente superiores aos de plantas Wild-type, praticamente em todos os parâmetros ecofisiológicos analisados ($p \leq 0,0001$; Figura 8), exceto, na C_i , quando não houve diferença significativa entre plantas AVP1OX e Wild-type (Figura 9A).

Em relação A e A/C_i , plantas tanto Wild-type quanto AVP1OX quando inoculadas com os micro-organismos apresentaram significativos incrementos nesses parâmetros quando comparados com seus respectivos controles não inoculados ($p \leq 0,001$; Figura 8 A, 9C).

Em plantas Wild-type, os maiores valores de G_s e E foram encontrados nos tratamentos inoculados com o fungo micorrízico *S. heterogama*, seja isoladamente seja co-inoculado com *H. seropedicae* ($p \leq 0,001$; Figura 8). Por outro lado, em plantas AVP1OX essas variáveis apresentaram valores maiores quando as plantas foram co-inoculadas *S. heterogama* e *H. seropedicae* ($p \leq 0,001$; Figura 8).

Em relação a C_i , em plantas Wild-type, as inoculações dos micro-organismos promoveram significativos incrementos quando inoculados individualmente, enquanto que em plantas AVP1OX apenas o tratamento inoculado com *H. seropedicae* apresentou incrementos significativos quando comparado com o tratamento não inoculado (Figura 9A).

A $iWUE$ foi significativamente superior em plantas Wild-type inoculadas com *H. seropedicae* e em plantas AVP1OX inoculadas com *S. heterogama* (Figura 9A). Por outro lado, nas plantas AVP1OX a A/C_i foi significativamente superior em relação ao controle apenas nas plantas inoculadas com o FMA *S. heterogama* ($p \leq 0,0001$; Figura 9C). Em A , g_s e E a maior variância ocorreu principalmente pela inoculação dos micro-organismos, com valores entre 58 e 71%. Por outro lado,

iWUE e A/Ci apresentaram maior variância na interação entre os micro-organismos e genótipos utilizados, com valores de 30 e 53%, respectivamente (Tabela 4).

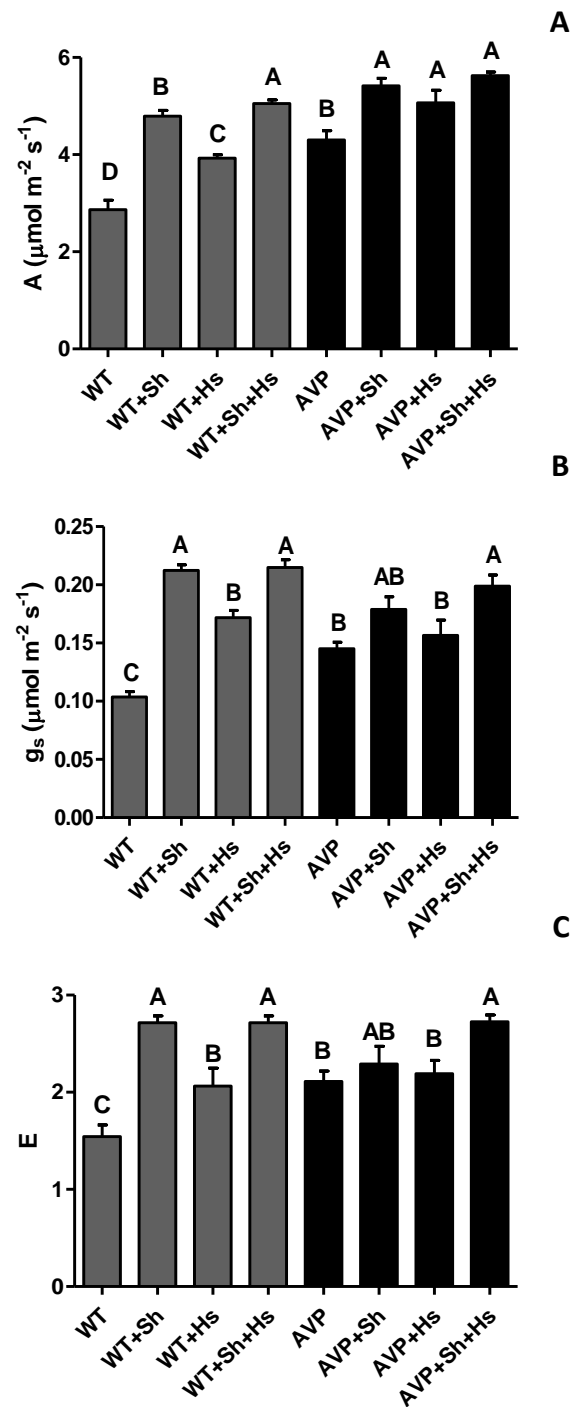


Figura 8. Assimilação de Carbono (A) (A); Condutância Estomática (g_s) (B); transpiração (E) (C) de Folhas de arroz, WT e AVP1OX, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

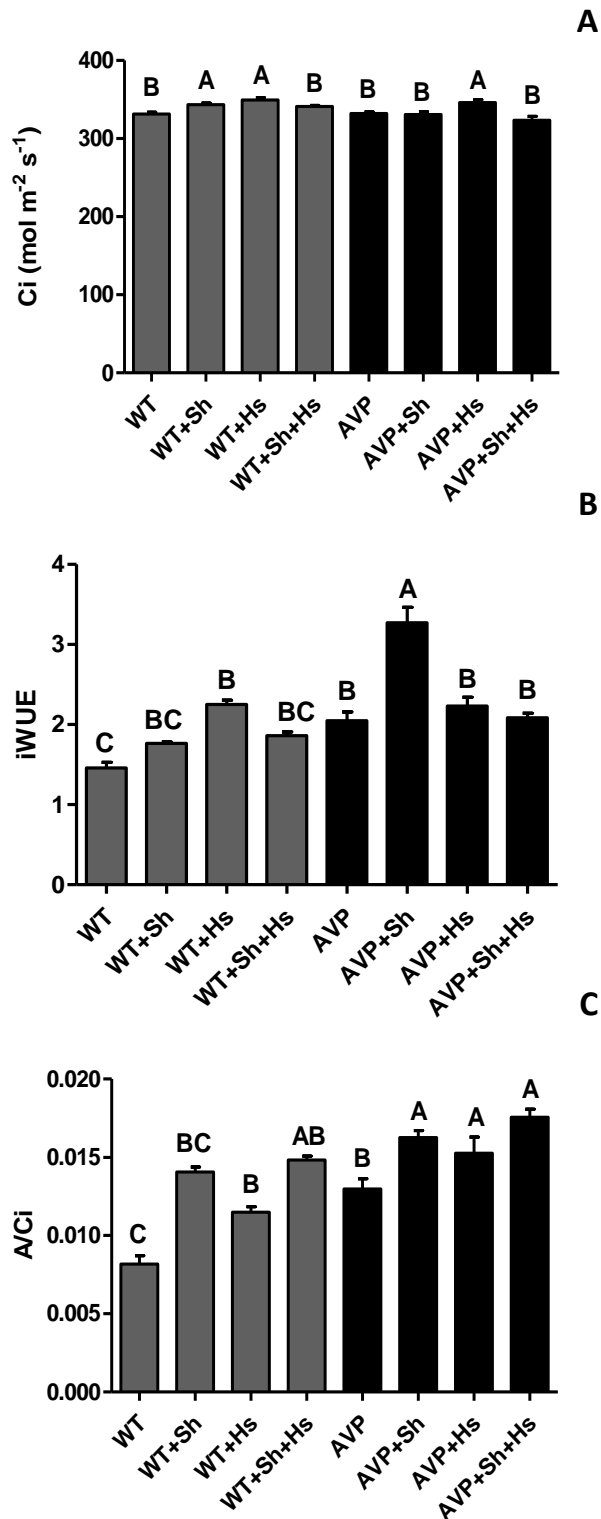


Figura 9. Concentração interna de carbono (Ci) (A); Eficiência no uso d'água (iWUE) (B); Eficiência na carboxilação (A/Ci) (C) de Folhas de arroz, WT e AVP1OX, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (n=4).

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com micro-organismos (Sh, Hs, Sh+Hs) nos parâmetros fotossintéticos de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. *** $p < 0.001$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficientes	GL	SQ	QM	F
a) Assimilação de Carbono				
Genótipo	1	7,144	7,144	72.23***
Inoculação	3	1738	4,911	49.65***
Genótipo x Inoculação	3	1,042	0,3472	3.511
Resíduo	24	2,374	0,09891	
b) Carboxilação				
Genótipo	1	8,740e-005	8,740e-5	69.48***
Inoculação	3	0,0001383	4,610e-5	36.65***
Genótipo x Inoculação	3	7,807e-006	2,602e-6	2.069
Resíduo	23	2,893e-005	1,258e-6	
c) Concentração Interna de CO₂				
Genótipo	1	526,8	526,8	16.47
Inoculação	3	1297	432,4	13.52***
Genótipo x Inoculação	3	395,0	131,7	4.117
Resíduo	23	735,6	31,98	
d) Transpiração				
Genótipo	1	0,03736	0,03736	0.5715
Inoculação	3	3,560	1,187	18.15***
Genótipo x Inoculação	3	0,9972	0,3324	5.084
Resíduo	23	1,504	0,06538	
e) Condutância Estomática				
Genótipo	1	0,0002663	0,0002663	0.9855
Inoculação	3	0,03283	0,01094	40.50***
Genótipo x Inoculação	3	0,006392	0,002131	7.884
Resíduo	24	0,006486	0,0002703	
f) iWUE				
Genótipo	1	2,541	2,541	65.36***
Inoculação	3	2,603	0,8677	22.32***
Genótipo x Inoculação	3	2,660	0,8866	22.81***
Resíduo	23	0,8940	0,03887	

5.3 – Atividade hidrolítica das ATPases e V-PPase

A atividade das P-ATPase, V-ATPase e V-PPase foram determinadas em fração microsomal isoladas de raízes de arroz AVP1OX e Wild-type, inoculadas com *S. heterogama* e *H. seropedicae*.

A atividade da P-ATPase em plantas AVP1OX foi 43% superior a de plantas Wild-type ($p \leq 0,0001$; Figura 10A). A inoculação de plantas AVP1OX ($p = 0,7210$) e Wild-type ($p = 0,8451$), com *S. heterogama* não induziu mudanças significativas na atividade hidrolítica da enzima quando comparado ao controle não inoculado (Figura 10A). Por outro lado, em plantas Wild-type, a co-inoculação dos micro-organismos promoveu uma ativação de 69% na atividade P-ATPase, enquanto em plantas AVP1OX foi observada uma inibição significativa de 25% ($p \leq 0,001$; Figura 10A).

A atividade da V-ATPase em plantas Wild-type, co-inoculadas com os micro-organismos simbiotes, foi estimulada em 1500%, enquanto que em plantas AVP1OX foi estimulada em 123% ($p \leq 0,0001$; Figura 10B). A inoculação individual dos micro-organismos em plantas Wild-type promoveu uma estimulação média na atividade da V-ATPas de 800%. A magnitude dessa estimulação na atividade da V-ATPase em plantas AVP1OX foi muito inferior ao observado nas Wild-type, uma vez que, essas plantas têm a atividade da bomba de prótons elevada, em torno de 500% (Figura 10 B). A inoculação dessas plantas com *S. heterogama* induziu uma estimulação de 123% e com *H. seropedicae* em 63%.

De fato, plantas com super-expressão no gene que codifica a H⁺-Pirofosfatase vacuolar, apresentaram uma estimulação de 1300% na atividade da V-PPase ($p \leq 0,001$; Figura 10C). A co-inoculação dos micro-organismos induziu uma estimulação de 8500% na atividade da V-PPase em plantas Wild-type e 385% em plantas AVP1OX. Destaca-se assim que em plantas com super-expressão da V-PPase a inoculação foi muito positiva, porém, a magnitude do ativação é muito superior em plantas Wild-type (Figura 10C). Ainda, em plantas AVP1OX a estimulação na atividade da V-PPase foi de 192% no tratamento com *S. heterogama* e 306% com *H. seropedicae* (Figura 10C). Por outro lado, em plantas Wild-type, a estimulação na atividade da V-PPase foi de 400% no tratamento com *S. heterogama* e 4300% com *H. seropedicae* (Figura 10C). A maior variância da atividade hidrolítica foi observada na interação dos micro-organismos para as

enzimas V-ATPase e V-PPase, com valores de 79 e 83% respectivamente. A P-ATPase apresentou maior variância na interação entre genótipos e os microorganismos utilizados, com valor de 68% (Tabela 5 A, B, C).

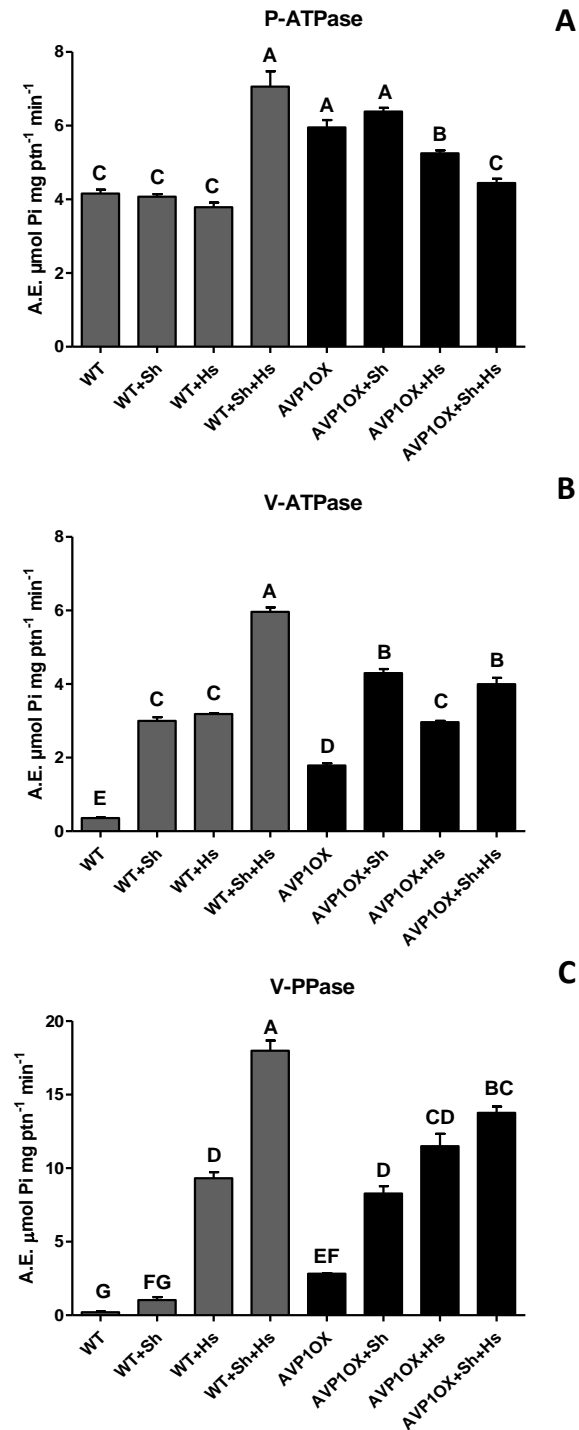


Figura 10. Atividade hidrolítica específica da H^+ -ATPase de membrana plasmática (P-ATPase) e vacuolar (V-ATPase), e da H^+ -Pirofosfatase vacuolar (V-PPase) na fração microsomal de raízes de *Oryza sativa*, super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-Ppase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Herb). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($n=4$).

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA) dos efeitos dos genótipos (WT e AVP1OX) e da inoculação com micro-organismos (Sh, Hs, Sh+Hs) na hidrólise e no transporte das bombas de próton de plantas de arroz. Houve interação entre os fatores. *** $p < 0.001$. Grau de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e teste F (F).

Coeficientes	GL	SQ	QM	F
a) Hidrólise P-ATPase				
Genótipo	1	4,359	4,359	74.55***
Inoculação	3	6,203	2,068	15.04***
Genótipo x Inoculação	3	30,74	10,25	31.72***
Resíduo	24	3,299	0,1374	
b) Hidrólise V-ATPase				
Genótipo	1	0,1442	5,041	4.081
Inoculação	3	63,37	21,12	597.7***
Genótipo x Inoculação	3	15,12	5,041	142.6***
Resíduo	24	0,8483	0,03535	
c) Hidrólise V-PPase				
Genótipo	1	30,45	30,45	33.47***
Inoculação	3	967,9	322,6	354.7***
Genótipo x Inoculação	3	133,3	44,44	48.86***
Resíduo	24	21,83	0,9096	
d) Velocidade Inicial P-ATPase				
Genótipo	1	1322	1322	72.60
Inoculação	3	6653	2218	121.8***
Genótipo x Inoculação	3	6177	2059	113.1***
Resíduo	8	145,6	18,20	
e) Velocidade Inicial V-ATPase				
Genótipo	1	658,4	658,4	60.83***
Inoculação	3	11864	3955	365.4***
Genótipo x Inoculação	3	1472	490,6	45.32***
Resíduo	8	86,59	10,82	
f) Velocidade Inicial V-PPase				
Genótipo	1	2521	2521	7.733
Inoculação	3	281165	93722	287.5***
Genótipo x Inoculação	3	67384	22461	68.90***
Resíduo	8	2608	326,0	

5.4 – Velocidade inicial de transporte de prótons

O transporte de prótons da P-ATPase em plantas Wild-type apresentou uma velocidade inicial (V_0) 61,91% superior ao encontrado em plantas AVP1OX (Figura 11A).

A inoculação de plantas Wild-type com *S. heterogama* apresentou uma inibição significativa de 29,8% na V_0 da P-ATPase (Figura 11A). Por outro lado, em plantas AVP1OX, a inoculação com *S. heterogama* induziu uma estimulação na V_0 de 335% enquanto com *Herbaspirillum seropedicae* foi de 223% e na co-inoculação foi de 392% (Figura 11A).

As velocidades iniciais do transporte de prótons das bombas vacuolares, em ambos os genótipos, foram similares, sendo uma estimulação de 1903% foi detectada em plantas Wild-type, no tratamento com a co-inoculação, enquanto uma estimulação de 266% foi encontrada em plantas AVP1OX (Figura 11B, C). Apesar de todos os fatores (interação, inoculação e genótipos) terem influenciado significativamente na variância dos resultados, a inoculação com os micro-organismos foi responsável pela maior parte da variância, com valores entre 46 e 84% (Tabela 5 D, E, F).

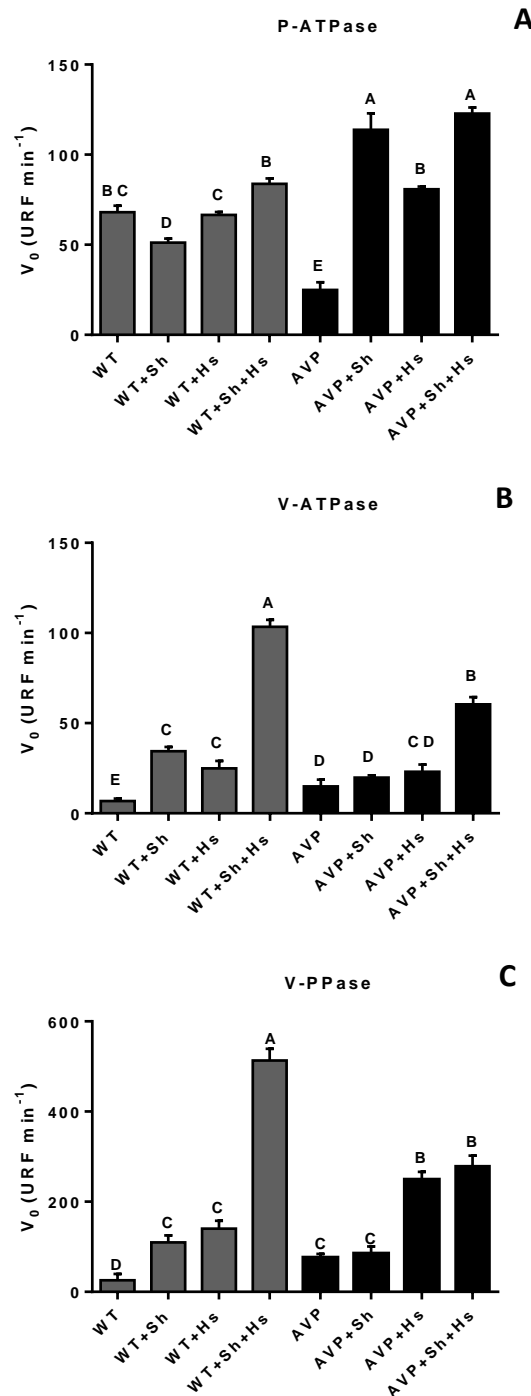


Figura 11. Velocidade inicial do transporter de H^+ da H^+ -ATPase de membrana plasmática (P-ATPase) e vacuolar (V-ATPase), e da H^+ -Pirofosfatase vacuolar (V-PPase) na fração microssomal de raízes de arroz WT e AVP1OX, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs). Médias seguidas de uma mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($n=4$).

5.5 - Análise do Western Blotting

A análise de western blotting usando anticorpos contra a P-ATPases de membrana plasmática revelaram que a quantidade de proteína imunorreativa no locus da PMA (aproximadamente 96 kD) aumentou cerca de 3,9 vezes nas membranas isoladas de raízes de arroz inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (Figura 12).

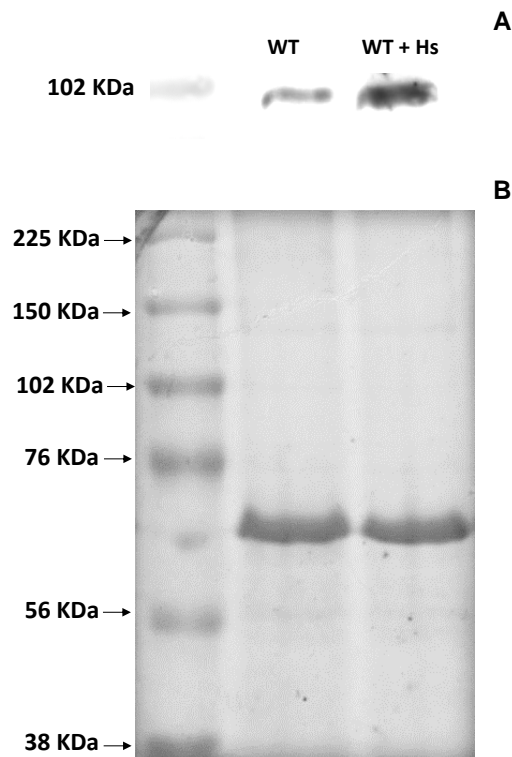


Figura 12: Western blotting da H⁺-ATPase de membrana plasmática. **(A)** immunoblotting da fração microssomal isolada de raízes de arroz após 90 dias, da inoculação, ou não, com a bactéria endofítica *H. seropedicae*. **(B)** Perfil de proteínas totais da fração microssomal de raízes de plantas de arroz coradas com Coomassie blue, em cada canal foram adicionadas 10 µg de proteínas totais.

5.6 – Um comparativo dos genótipos Wild-type e AVP1OX no potencial de estimulação ou inibição dos parâmetros estudados

Na tabela 6 foi analisado a porcentagem de estimulação nas plantas arroz AVP1OX em relação as plantas Wild-type. Pode-se observar que dentre todos os 28 parâmetros analisados, apenas 2 apresentaram inibição nestas plantas (Fe e V_o P-ATPase). Plantas wild-type apresentaram estimulação superior as plantas transgênicas em 70% dos parâmetros analisados, sugerindo que estas plantas apresentam maior dependência dos micro-organismos simbiotes que as plantas AVP1OX (Tabela 7).

Tabela 6: Porcentagem de estimulação de todos os parâmetros analisados nas plantas de arroz transgênicas super-expressando a V-PPase em relação as plantas Wild-type.

Variáveis	% de estimulação ou inibição em plantas AVP1OX baseado no controle WT
Altura	3,09648
Diâmetro	12,97297
Massa seca	10,25641
N	0,526778
P	29,45151
K	46,55345
Ca	14,13915
Mg	59,76331
S	36,11632
B	25,41485
Cu	43,53698
Mn	62,78102
Fe	-4,3659
Zn	266,8026
Mo	81,2302
Ni	948,1707
A	50,19197
gs	40,05792
E	36,7228
Ci	0,15083
iWUE	40,53498
A/Ci	58,7321
P-ATPase	43,16979
V-ATPase	401,2637
V-PPase	1240,446
V0 P-ATPase	-63,3426
V0 V-ATPase	119,4979
V0 V-PPase	196,4481

Tabela 7: Porcentagem de estimulação ou inibição nos parâmetros analisados dependente dos micro-organismos em plantas de arroz transgênicas super-expressando a V-PPase ou Wild-Type.

Variáveis analisadas	Porcentagem de estimulação ou inibição nos parâmetros estudados (%)							
	WT+Sh	WT+Hs	WT+Sh+Hs	Média	AVP1OX+Sh	AVP1OX+Hs	AVP1OX+Sh+Hs	Média
Altura	13,10	54,50	51,24	39,61	13,44	52,70	53,49	39,88
Diâmetro	6,49	67,03	87,03	53,51	10,05	47,37	75,12	44,18
Massa seca	21,37	200,55	232,99	151,64	15,50	194,88	170,54	126,98
N	21,86	128,88	119,84	90,19	30,48	97,73	82,88	70,36
P	112,24	355,09	416,30	294,54	65,27	195,61	200,40	153,76
K	65,83	465,83	440,46	324,04	6,54	292,37	261,76	186,89
Ca	76,85	158,67	178,61	138,05	70,79	127,28	144,30	114,12
Mg	91,32	106,07	148,03	115,14	23,92	55,37	20,83	33,37
S	-92,93	-83,26	-88,14	-88,11	-92,09	-81,43	-88,63	-87,38
B	607,07	229,69	212,14	349,64	-10,38	169,71	123,54	94,29
Cu	211,25	276,85	214,08	234,06	57,62	108,96	65,95	77,51
Mn	15,36	88,38	129,10	77,62	-29,69	15,93	-29,34	-14,36
Fe	158,21	-28,84	34,74	54,71	220,87	-5,67	38,37	84,52
Zn	851,84	4098,31	293,79	1747,98	6,42	454,75	62,06	174,41
Mo	214,41	450,29	292,03	318,91	29,35	135,11	76,69	80,38
Ni	27,80	634,76	233,66	298,74	-99,49	-98,74	-81,60	-93,27
A	67,29	37,10	76,37	60,26	25,91	17,82	30,79	24,84
gs	105,02	65,83	107,43	92,76	23,29	7,93	37,08	22,77
E	75,97	33,61	75,97	61,85	8,57	3,84	29,09	13,83
Ci	3,62	5,43	2,96	4,00	-0,33	4,28	-2,56	0,46
iWUE	20,99	54,39	27,78	34,39	59,69	8,88	1,71	23,43
A/Ci	71,95	40,74	81,37	64,69	25,29	17,66	35,31	26,09
P-ATPase	-2,07	-8,87	69,82	19,62	7,24	-11,81	-25,35	-9,97
V-ATPase	742,74	794,69	1574,53	1037,32	140,73	65,99	123,98	110,23
V-PPase	391,70	4319,16	8430,11	4380,32	192,85	306,44	387,09	295,46
V0 P-ATPase	-24,75	-2,32	23,10	-1,32	355,93	223,60	392,39	323,97
V0 V-ATPase	406,53	265,73	1418,13	696,80	32,24	54,65	304,68	130,52
V0 V-PPase	327,79	446,84	1903,12	892,58	11,78	227,19	266,95	168,64

5.7 - Análise multivariada (PCA)

A partir da análise de correlação foi possível observar que parâmetros de crescimento, acúmulo de macro e micronutrientes, parâmetros fisiológicos e bioquímicos apresentaram maior relação para com os tratamentos que foram inoculados com a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, tanto para plantas de arroz Wild-type e transgênicos AVP1OX. No entanto, as plantas co-inoculadas apresentaram maior acúmulo de Mn e Mo, maior influência nos parâmetros fisiológicos e nas atividades hidrolíticas e da V_0 de transporte de H^+ para as enzimas P-ATPase, V-ATPase e V-PPase. Por outro lado, plantas inoculadas isoladamente com a bactéria *H. seropedicae* apresentaram maiores acúmulos de N, P, B, Cu, Ni, Fe e Zn, além de maiores incrementos na altura e peso seco (Figura 13).

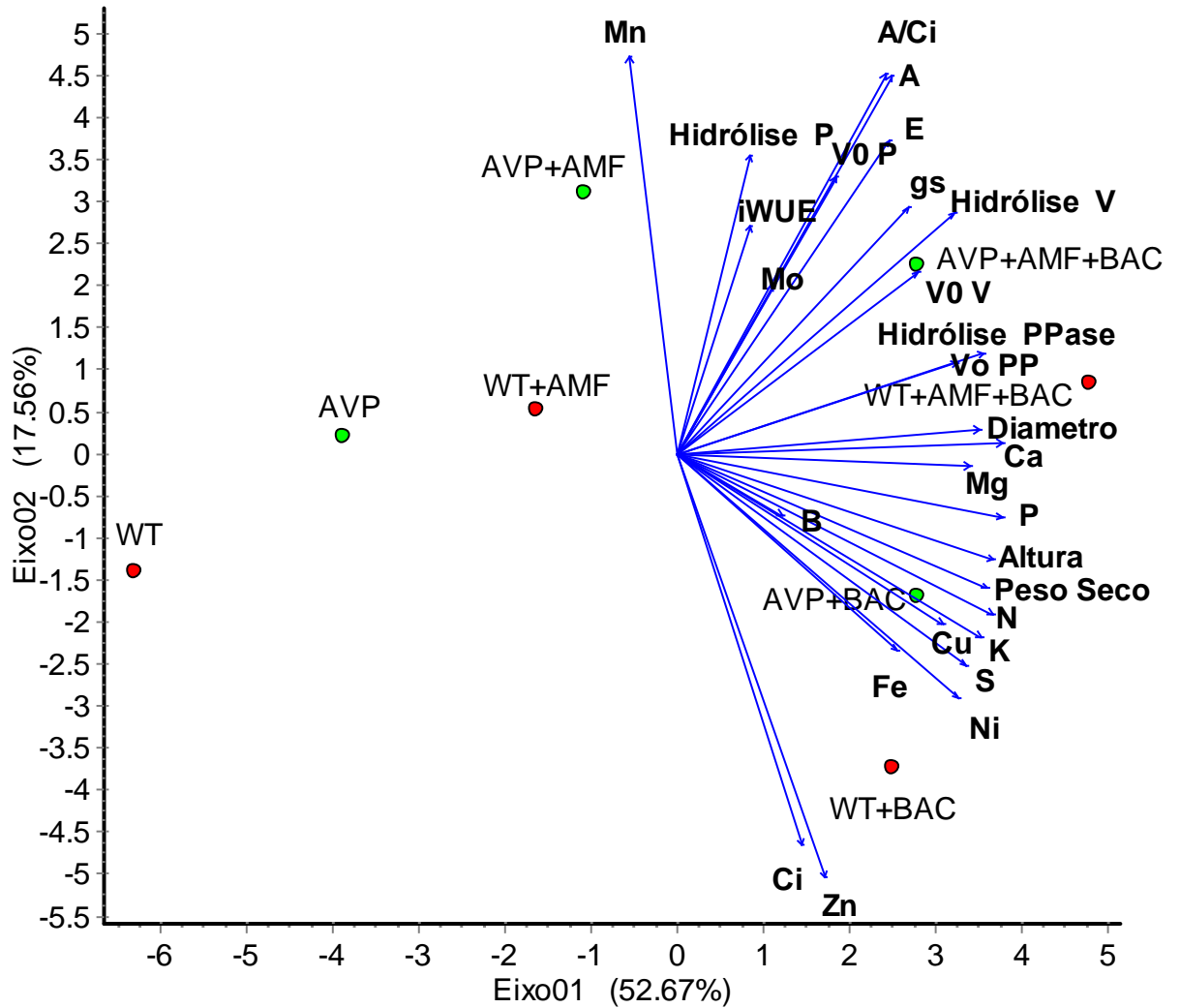


Figura 13: Análise multivariada dos parâmetros de crescimento, fisiológicos, acumulação de macro e micronutrientes e bioquímicos de plantas de arroz, super-expressando (AVP1OX) ou não (WT) a V-PPase, aos 90 dias após a inoculação individual ou associada entre o fungo micorrízico arbuscular *Scutellospora heterogama* (Sh) e a bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae* (Hs).

6 - DISCUSSÃO

Processos microbiológicos, como a fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fosfatos naturais, assim como o uso de plantas geneticamente modificadas são estratégias importantes para aumentar produção mundial de alimentos, sem elevação na área plantada.

Plantas transgênicas super-expressando a V-PPase foram descritas por promoverem o crescimento e a produção dos vegetais, incluindo tomate e arroz, justamente pela ativação dos sistemas primários e secundários de transporte de prótons, bem como pela maior capacidade de absorver água em solos com baixo potencial hídrico (Park et al., 2005; Yang et al., 2007; Gaxiola et al., 2011; Yang et al., 2014). Nesse mesmo contexto, inóculos bacterianos têm sido propostos para uso em grandes culturas, tendo as bactérias do gênero *Herbaspirillum* apresentado benefícios não só em termos de economia no que tange a nutrição nitrogenada, bem como na promoção de diversos outros fatores envolvidos com o crescimento vegetal e resistência a estresses (James et al., 2002; Aguiar et al., 2015).

Em análises preliminares, verificamos certa similaridade entre o fenótipo destas plantas com o apresentado por plantas inoculadas, o que poderia estar associada com mecanismos de ação semelhantes, dado que existem evidências de ativação das bombas de H⁺ induzidas tanto por bactérias quanto por fungos micorrízicos (Day et al., 1995; Ramos et al., 2008).

Neste trabalho relatamos incrementos na altura das plantas, no diâmetro da base do caule e na massa seca da parte aérea de plantas de arroz inoculadas com a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. Este efeito foi semelhante ao

descrito por Zhan et al. (2016) em plantas de *Camellia sinensis* inoculadas com esta bactéria. Tal efeito tem sido correlacionado com benefícios advindos da fixação biológica do nitrogênio, mas também da síntese bacteriana de fitormônios, ou mesmo como resultante de um efeito sinérgico destes dois fatores. Estudos anteriores relataram um maior potencial de bactérias deste gênero na síntese de substâncias promotoras do crescimento vegetal, quando comparadas a outros tipos de diazotróficos, relacionando tal desempenho com seu hábito endofítico (Cocking, 2003; Baldani e Baldani, 2005).

As mesmas plantas de arroz quando inoculadas com o fungo micorrízico *S. heterogama* não apresentaram incrementos significativos em termos de crescimento, apesar das taxas normais de colonização (55-65%) micorrízica radicular. Estudos realizados por Vallino et al. (2014) descrevem uma relação inversa entre a eficiência da simbiose micorrízica de plantas de arroz e o nível de hidratação do solo. Neste estudo, as plantas foram cultivadas em condições ótimas de hidratação e nutrição, visando isolar um possível efeito diferencial da inoculação sobre o crescimento vegetal, dissociado dos parâmetros nutricionais. De fato, existem também dados na literatura indicando que em condições de nutrição fosfatada ótima diminuí os efeitos positivos da micorrização, podendo até mesmo influenciar na transição do estado de simbiose para parasitismo (Campos et al., 2013; Nouri et al., 2014).

Em relação aos parâmetros fisiológicos, as plantas de arroz inoculadas com os micro-organismos promotores do crescimento vegetal apresentaram aumento na A , g_s , E , $iWUE$ e na relação A/C_i . Porcel et al. (2015) analisando o efeito da inoculação micorrízica em plantas de arroz expostas ao estresse salino mostraram que estas plantas quando inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram maiores valores de A , g_s e E , inclusive nas plantas não estressadas, semelhante ao observado no presente estudo. Apesar do aumento em E e g_s , não houve diferença na eficiência no uso da água nas plantas micorrizadas e não-micorrizadas, refletindo numa maior assimilação de carbono. Acredita-se que este aumento nas trocas gasosas das plantas micorrizadas, se deva ao aumento na absorção de nutrientes, alteração nos níveis hormonais da planta hospedeira e maior capacidade de absorção de água (Ebel et al., 1997; Goicoechea et al., 1997; Sheng et al., 2008; Ruiz-Lozano e Aroca, 2010) influenciando na capacidade fotossintética destas plantas (Birhane et al., 2012). Estes dados sugerem que

mesmo sem apresentar diferenças significativas nos parâmetros de crescimento, a inoculação com o fungo micorrízico induziu mudanças fisiológicas que podem prover a planta uma maior robustez metabólica que se refletiria numa maior capacitação a resistir a estresses. Todavia, tal hipótese requer experimentos adicionais para ser validada.

Alguns estudos têm defendido que o uso integrado de fungos micorrízicos arbusculares com bactérias promotoras do crescimento tem o potencial de sinergicamente estimular o crescimento da planta hospedeira através de mecanismos que incrementam o importe de nutrientes (Artursson et al., 2006; Awasthi et al., 2011). Awasthi et al. (2011) mostraram que a inoculação de plantas *Artemisia annua* com bactérias fixadoras do nitrogênio, isoladas da rizosfera de solos de plantas da mesma espécie, apresentaram maiores conteúdos de N, P e K em relação ao controle. Estes dados corroboram com os encontrados no presente estudo, onde plantas de arroz quando inoculadas com a BFN *H. seropedicae* apresentaram maior conteúdo destes macro-nutrientes. Entretanto, o mesmo estudo mostrou que quando as plantas eram co-inoculadas com BFN e o FMA *Glomus mosseae* o efeito na absorção de nutrientes foi amplificado. Todavia, nossos resultados apontam a ausência de tal efeito sinérgico, indicando que o efeito positivo se deva principalmente a presença da bactéria, apesar das plantas inoculadas com o FMA ter contribuído na absorção de P. A importância deste micro-organismos para a nutrição de fósforo já é bem descrita em diversos estudos (Chandrashekara et al., 1995; Lee et al., 2014; Mensah et al., 2015) (Figura 4 A, B e C). Ortiz et al. (2015), mostraram que plantas inoculadas com FMA e BPCV apresentam efeitos sinérgicos também nos parâmetros fotossintéticos, enquanto dados do presente estudo não evidenciaram diferenças de tal sinergia na fotossíntese em resposta a co-inoculação.

Nas condições ótimas de cultivo, plantas de arroz super-expressando a H⁺-Pirofosfatase Vacuolar apresentaram parâmetros de crescimento semelhantes aos observados nas plantas Wild type quando não inoculados com os micro-organismos promotores do crescimento vegetal. Park et al., (2005) realizaram estudos com arroz mutante AVP1OX, onde estas apresentaram crescimento superior as plantas Wild-type, mas quando expostas ao estresse hídrico, corroborando com o que foi descrito originalmente por Li et al. (2005).

Yang et al. (2014) mostraram que plantas AVP1OX não apresentam crescimento superior ao das plantas Wild-type quando não expostas à estresse, tal qual os resultados obtidos neste estudo. Anteriormente Yang et al. (2007) mostraram que plantas de arroz super-expressando a V-PPase Vacuolar (AVP1OX) em solos pobres em fosfato apresentaram maior conteúdo de macronutrientes quando comparadas às plantas Wild-type.

Sabe-se que a transgenia existente nas plantas AVP1OX promove maior atividade não somente das V-PPases, mas também das P-ATPases de membrana plasmática, assim como maior expressão de proteínas PIN, promovendo maior fluxo de auxina entre as células (Gaxiola et al., 2007; Li et al., 2005). Estes estudos correlacionaram o maior fluxo de auxina com a ativação das bombas de H⁺ e com o incremento do sistema radicular, devido a indução de raízes laterais, o que responderia pela maior capacidade de absorção de nutrientes e água que tais plantas apresentam em condições de estresse (Gaxiola, 2007). Entretanto, plantas AVP1OX cultivadas com um suprimento ótimo de P se comportaram como plantas Wild-type, resultados semelhantes ao encontrados por Lv et al., (2015) com *A. thaliana* super-expressando a V-PPase, cultivadas sob condições ótimas de nutrição nitrogenada. No presente estudo, também não foram observadas diferenças entre plantas Wild-type e AVP1OX no conteúdo total dos macronutrientes sob condições ótimas de nutrientes no solo.

As plantas AVP1OX apresentaram taxas de assimilação de carbono, condutância estomática e transpiração superiores as encontradas em plantas wild-type. Estes dados corroboram com os encontrados por Lv et al. (2008), em plantas de algodão transgênicas super-expressando a V-PPase. É possível que plantas AVP1OX apresentem um maior poder de vacuolação, devido a indução da V-PPase, o que promoveria um aumento da pressão de turgor vacuolar requerida para o alongamento celular e outros processos. Tem sido descrito o aumentando a pressão de turgor em células estomáticas, induzindo abertura dos poros estomáticos, aumento da condutância estomática, e conseqüentemente nas trocas gasosas e na taxa de assimilação de carbono (Pasapula et al., 2011; Qin et al., 2013).

Apesar da assimilação de carbono, condutância estomática e transpiração de plantas inoculadas com o *S. heterogama* apresentarem valores superiores às

plantas inoculadas somente com a bactéria *H. seropedicae*, estas últimas apresentaram estimulações em relação ao controle.

Souza et al. (2015) relataram que *A. thaliana* inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresenta uma elevação na taxa fotossintética e redução na transpiração, refletindo uma maior eficiência no uso da água. No presente trabalho, a taxa de transpiração em plantas de arroz inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* foi maior em relação as plantas controle, mas o estímulo na assimilação do carbono nestas plantas foi ainda mais elevada, indicando que a simbiose com a bactéria endofítica também induziu uma maior eficiência no uso d'água neste caso. Efeitos benéficos da inoculação com BPCV sobre a capacidade fotossintética têm sido relacionados a um maior fluxo de fitormônios e maior poder na absorção de nutrientes (Peng et al. 2002; Zhou et al., 2006; Bhattacharjee et al., 2008; Del Amor e Cuadra-Crespo, 2012). Plantas inoculadas com bactérias diazotróficas também podem apresentar estimulações de sistemas enzimáticos associados a assimilação de carbono, como descrito para o fotossistema II (Souza et al., 2015).

Evidências sugerem que muitos dos benefícios promovidos pela bactéria *H. seropedicae* também se devam a produção de auxina (Bastian et al., 1998), a qual uma vez secretada pela bactéria induziria um maior volume radicular, maior número de raízes laterais e maior capacidade de absorção de nutrientes, resultando numa maior promoção do crescimento vegetal (Baldani et al., 2000; Canellas et al., 2013). Células vegetais quando entram em contato com a auxina apresentam respostas tanto transcricionais quanto pós-transcricionais. Respostas a auxina desencadeadas de segundos a poucos minutos, indicam uma regulação em nível pós-transcricional, envolvendo a ativação das H⁺-ATPases já presentes na célula (e.g., Kim et al., 2001; Takahashi et al., 2012). Este maior bombeamento de H⁺ desencadeia a ativação de diversas cascatas de sinalização, que culminam em maior expressão de várias proteínas, inclusive das H⁺-ATPases de membrana plasmática, sendo esta a modulação em nível transcricional (Hager et al., 1991). Assim, a ação da auxina desencadeia uma regulação complexa da atividade e expressão destas bombas de H⁺, coordenando a manutenção e modulação do gradiente de H⁺ nas membranas. A ativação destas bombas induz também a acidificação do apoplasto, necessária para a ativação de expansinas e de outras

enzimas que promovem o afrouxamento da parede celular, num processo descrito na clássica Teoria do Crescimento Ácido (Rayle e Cleland, 1992).

Nas condições do presente estudo, as atividades das H⁺-ATPases de membrana plasmática inoculadas com FMA não apresentaram qualquer sinal de ativação, havendo até mesmo inibição no transporte de H⁺. No caso da inoculação com a *H. seropedicae*, apesar de não se ter efeito sobre as atividades da bomba, sua expressão foi expressivamente estimulada.

Teoricamente, a exudação de auxinas produzidas por esta bactéria (Bastian et al., 1998), poderia ser responsável pelo efeito na expressão desta H⁺-ATPase. Todavia, para responder como a força motriz do crescimento das plantas de arroz inoculadas por este micro-organismo (Falhof et al., 2015), seria esperada a respectiva estimulação da atividade de bombeamento de H⁺. A resposta observada parece sugerir uma modulação pós-transcricional complexa, envolvendo efeitos de ativação mais pronunciados sobre as bombas de H⁺ (V-ATPase e V-PPase) vacuolares do que sobre a P-ATPase. Zandonadi et al. (2007) descreveram uma regulação conjunta da atividade das P-ATPases com as bombas de H⁺ vacuolares, indicando que os efeitos já descritos nas células vegetais em resposta a auxina dependem não somente da ativação de uma das bombas, mas sim de uma resposta orquestrada de todas elas.

Dünser e Kleine-Vehn (2015) também descreveram a ação da auxina no processo de expansão celular como dependente do afrouxamento da parede celular e da expansão vacuolar, numa resposta controlada dos dois fatores, com participação direta das ativação das bombas de H⁺. A este processo os autores denominaram teoria “Balão” do crescimento ácido. Os dados obtidos apontam para uma modulação em nível tanto pré quanto pós-transcricional das bombas de H⁺, uma vez que foi observado um desacoplamento das P-ATPases em contraste com um aumento de expressão desta enzima. Quanto as ativações das bombas de prótons vacuolares, uma descrição mais detalhada do fenômeno ainda requer análises da expressão destas enzimas.

Plantas de arroz AVP1OX apresentaram uma ativação na atividade hidrolítica das V-PPase em relação às plantas Wild-type, como esperado para as plantas que super-expressam a V-PPase. Porém quando analisamos o transporte de H⁺ dependente de PPi, estas plantas apresentam uma inibição em relação as plantas Wild-type. Estudos vem mostrando que a super-expressão desta proteína,

ocasiona também um aumento da atividade hidrolítica e do transporte de H^+ dependente de PPI (Paez-Valencia et al., 2013). No presente estudo baseados nos dados da atividade hidrolítica e do transporte de H^+ , observamos que plantas AVP1OX apesar da super-expressão apresentaram um desacoplamento destas proteínas sob condições ótimas de crescimento, isto pode indicar a existência de um desacoplamento funcional. Uma hipótese é que em plantas com super-expressão da V-PPase vacuolar sob condições normais de crescimento, estas enzimas podem atuar na reciclagem de fosfato, através da regulação de um desacoplamento incomum e ainda inexplorada, como postulado por Venancio et al. (2013).

A possibilidade é muito interessante do ponto de vista bioenergético, pois estas proteínas utilizam um substrato simples, de baixo custo energético que é gerado como produto de diversos processos biossintéticos por macromoléculas, como proteínas, RNA e polissacarídeos. Isto está de acordo com a noção de como as plantas reagem as constantes mudanças no meio ambiente e ao mesmo tempo mantem as condições metabólicas em estado ótimo, para isso a expressão, atividade e a ação recíproca das bombas de prótons devem estar fortemente reguladas (Gaxiola et al., 2007; Zandonadi et al., 2007). Assim como os resultados encontrados por Venancio et al. (2013), o presente estudo pode prover informações para um melhor entendimento de como plantas transgênicas com super-expressão da V-PPase apresentam maior tolerância a deficiência de Pi (Yang et al., 2007), dentre outros benefícios da transgenia (Gaxiola et al., 2001; Guo et al., 2006; Brini et al., 2007; Paez-Valencia et al., 2013).

7 - CONCLUSÃO

A inoculação de plantas de arroz com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* promoveu incrementos significativos em todos os parâmetros de crescimento e na absorção de todos os macronutrientes analisados no presente estudo. Entretanto, a inoculação destas mesmas plantas com *S. heterogama* não apresentou o mesmo efeito, com exceção de ter aumentado o conteúdo de P. Foi observado também que a inoculação dos micro-organismos modulou diferencialmente as bombas de H^+ nestas plantas. Nossos dados sugerem que os benefícios da inoculação das plantas de arroz pela *H. seropedicae* ocorra, dentre outros fatores, devido a uma ativação orquestrada das P-ATPases, V-ATPases e V-PPases, em resposta ao fitormônio auxina produzido por estas bactérias. Em relação as plantas transgênicas (AVP1OX), não houveram vantagens em relação ao genótipo Wild-type nas taxas de crescimento e no conteúdo de macronutrientes. Nossos dados indicam que plantas Wild-type apresentam maior dependência dos micro-organismos para seu crescimento, sendo então, mais favoráveis para a inoculação com os micro-organismos simbiotes. Por fim, não foi possível observar vantagens da co-inoculação dos micro-organismos utilizados neste estudo na promoção de crescimento de plantas de arroz.

Em resumo, nossos dados evidenciam, através de parâmetros fisiológicos, que a bactéria *H. seropedicae* inoculada tanto em plantas Wild-type como plantas AVP1OX, são mais eficientes na promoção do crescimento vegetal, indicando que a utilização destes micro-organismos em culturas de interesse econômico podem ser uma alternativa ecológica para a redução na aplicação de fertilizantes químicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, N. O., Medici, L. O., Olivares, F. L., Dobbss, L. B., Torres-Netto, A., Silva, S. F., Canellas, L. P. (2015). Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology*.

Arruda, L.; Beneduzi, A.; Martins, A.; Lisboa, B.; Lopes, C.; Bertolo, F.; Passaglia, A. M. P.; Vargas, L. K. (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology*, v. 63, p. 15-22.

Artursson, V., Finlay, R. D., Jansson, J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental microbiology*, 8(1), 1-10.

Awasthi, A., Bharti, N., Nair, P., Singh, R., Shukla, A. K., Gupta, M. M., Kalra, A. (2011). Synergistic effect of *Glomus mosseae* and nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain Daz26 on artemisinin content in *Artemisia annua* L. *Applied soil ecology*, 49, 125-130.

Azcón-Aguilar, C.; Barea, J. M. (1996) Arbuscular mycorrhizal and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, Berlin, v. 6, p. 457-464.

Babalola, O. O. (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett*, v. 32, n. 11, p. 1559-70.

Baldani, J. I., Baldani, V. L. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), 549-579.

Baldani, J. I.; Baldani V. L. D.; Sampaio M. J. A. M.; Döbereiner J. (1984) A 4TH AZOSPIRILLUM SPECIES FROM CEREAL ROOTS. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, v. 56, n. 3, p. 365-365.

Baldani, J. I.; Baldani, V. L. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc*, v. 77, n. 3, p. 549-79.

Baldani, V. D., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6), 485-491.

Balsanelli, E.; Serrato, R. V.; De Baura, V. A.; Sasaki, G.; Yates, M. G.; Rigo, L. U.; Pedrosa, F. O.; De Souza, E. M.; Monteiro, R. A. (2010) *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ Microbiol*, v. 12, n. 8, p. 2233-44.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24(1), 7-11.

Baxter, I. R.; Vitek, O.; Lahner, B.; Muthukumar, B.; Borghi, M.; Motissey, J.; Guerinot, M. L.; Salt, D. E. (2008) The Leaf Ionome as a Multivariable System to Detect a Plant's Physiological Status. *PNAS*. v. 105, pp. 12081-12086.

Bethlenfalvai, G. J.; Lindcann, R. G. (1992) Mycorrhizae in Sustainable Agriculture, *Am. Soc. Agron. Special Publication*. v.54, American Society of Agronomy, Madison.

Bhattacharjee, R. B., Singh, A., Mukhopadhyay, S. N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 199-209.

Bhattacharjee, R. B.; Singh, A.; Mukhopadhyay, S. N. (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 2, p. 199-209.

Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. (2012) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. V. 28, pp. 1327-1350.

Birhane, E., Sterck, F. J., Fetene, M., Bongers, F., Kuyper, T. W. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia*, 169(4), 895-904.

Bonneau, L.; Huguet, S.; Wipf, D.; Pauly, N.; Truong, H. N. (2013) Glomeromycotan mycorrhizal fungi from tropical Australia. III Measuring diversity in natural and disturbed habitats. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 370, p. 419-433.

Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G. A., Masmoudi, K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt-and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 301-308.

Brundrett, M. C.; Ashwath, N. (2013) Glomeromycotan mycorrhizal fungi from tropical Australia III. Measuring diversity in natural and disturbed habitats. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 370, p.419-433.

Campos, M. C., Pearse, S. J., Oliveira, R. S., Lambers, H. (2013). *Viminaria juncea* does not vary its shoot phosphorus concentration and only marginally decreases its mycorrhizal colonization and cluster-root dry weight under a wide range of phosphorus supplies. *Annals of botany*, 111(5), 801-809.

Canellas, L. P., Balmori, D. M., Médici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C., Olivares, F. L. (2013). A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and soil*, 366(1-2), 119-132.

Carvalhais, L. C.; Dennis, P. G.; Fan, B.; Fedoseyenko, D.; Kierul, K.; Becker, A.; Von Wiren, N.; Borriss, R. (2013) Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. *Plos One*, v. 8, n. 7, p. 13, 2013.

Castagno, L. N., García, I. V., Sannazzaro, A. I., Bailleres, M., Ruiz, O. A., Mendoza, R. E., Estrella, M. J. (2014). Growth, nutrient uptake and symbiosis with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in *Lotus tenuis* plants fertilized with different phosphate sources and inoculated with the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea eucalypti* M91. *Plant and soil*, 385(1-2), 357-371.

Cavagnaro, T.R.; Gao, L.L.; Smith, S.E; Smith, P. (2001) Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist*, London, v. 151, p. 469-475, 2001.

Chandrashekara, C. P., Patil, V. C., Sreenivasa, M. N. (1995). VA-mycorrhiza mediated P effect on growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) at different P levels. *Plant and Soil*, 176(2), 325-328.

Chubatsu, L. S.; Monteiro, R.; Wassen, R.; Bonatto, A. C.; Huergo, L.; Pedrosa, F. O. (2012) Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-2.

Cocking, E. C. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant Soil* 252:169–175

Cruz, L. M.; De Souza, E. M.; Weber, O. B.; Baldani, J. I.; Döbereiner, J.; Pedrosa, F. O. (2001) 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2375-2379.

del Amor, F. M., Cuadra-Crespo, P. (2012). Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Functional Plant Biology*, 39(1), 82-90.

Deaker, R., Roughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1275-1288.

Dünser, K., Kleine-Vehn, J. (2015). Differential growth regulation in plants—the acid growth balloon theory. *Current opinion in plant biology*, 28, 55-59.

Duvick, D. N. (2005) The contribution of breeding to yield advances in maize. pp. 83-145. In: D.N. Sparks (Ed.), *Adv. Agron.*, Vol. 86. Academic Press, San Diego, CA.

Ebel, R. C., Duan, X., Still, D. W., Augé, R. M. (1997). Xylem sap abscisic acid concentration and stomatal conductance of mycorrhizal *Vigna unguiculata* in drying soil. *New phytologist*, 135(4), 755-761.

Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., de Oliveira, D. M., Urquiaga, S., & Baldani, J. I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant and soil*, 369(1-2), 115-129.

Falhof, J., Pedersen, J. T., Fuglsang, A. T., & Palmgren, M. (2015). Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Molecular Plant*.

- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of biotechnology*, 151(4), 303-311.
- Gamper, H., Peter, M., Jansa, J., Lüscher, A., Hartwig, U. A., Leuchtman, A. (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi benefit from 7 years of free air CO₂ enrichment in well-fertilized grass and legume monocultures. *Global Change Biology*, 10(2), 189-199.
- Gange, A. C. (2001). Species-specific responses of a root-and shoot-feeding insect to arbuscular mycorrhizal colonization of its host plant. *New Phytologist*, 150(3), 611-618.
- Gaxiola, R. A., Edwards, M., Elser, J. J. (2011). A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. *Chemosphere*, 84(6), 840-845.
- Gaxiola, R. A., Li, J., Undurraga, S., Dang, L. M., Allen, G. J., Alper, S. L., Fink, G. R. (2001). Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11444-11449.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *Febs Letters*, 581(12), 2204-2214.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Goicoechea, N., Antolin, M. C., Sánchez-Díaz, M. (1997). Gas exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 989-997.

Grant, C. A., Wu, R., Selles, F., Harker, K. N., Clayton, G. W., Bittman, S., Lupwayi, N. Z. (2012). Crop yield and nitrogen concentration with controlled release urea and split applications of nitrogen as compared to non-coated urea applied at seeding. *Field Crops Research*, 127, 170-180.

Guo, S., Yin, H., Zhang, X., Zhao, F., Li, P., Chen, S., Zhang, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, SsVP, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 60(1), 41-50.

Gyaneshwar, P., James, E. K., Reddy, P. M., Ladha, J. K. (2002). Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*, 154(1), 131-145.

Hager, A., Debus, G. G. E. H., Edel, H. G., Stransky, H., Serrano, R. (1991). Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 185(4), 527-537.

Han, M., Okamoto, M., Beatty, P. H., Rothstein, S. J., & Good, A. G. (2015). The Genetics of Nitrogen Use Efficiency in Crop Plants. *Annual review of genetics*, 49, 269-289.

James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P., Ladha, J. K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894-906.

James, E. K., Olivares, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(1), 77-119.

James, E. K., Olivares, F. L., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1997). *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue 3Sorghum bicolor L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, 48(3), 785-798.

Jin, H., Liu, J., Liu, J., Huang, X. (2012). Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Science China Life Sciences*, 55(6), 474-482.

Kim, Y. S., Min, J. K., Kim, D., Jung, J. (2001). A soluble auxin-binding protein, ABP57 purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10730-10736.

Kloepper, J. W.; Schroth, M. N. (1979) Plant-growth promoting rhizobacteria - evidence that the mode of action involves root microflora interactions. *Phytopathology*, v. 69, n. 9, p. 1034-1034.

Ladha, J. K., Pathak, H., Krupnik, T. J., Six, J., van Kessel, C. (2005). Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. *Advances in agronomy*, 87, 85-156.

Leal, P. L., Siqueira, J. O., Stürmer, S. L. (2013). Switch of tropical Amazon forest to pasture affects taxonomic composition but not species abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal community. *Applied soil ecology*, 71, 72-80.

Lee, M. R., Tu, C., Chen, X., Hu, S. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance P uptake and alter plant morphology in the invasive plant *Microstegium vimineum*. *Biological invasions*, 16(5), 1083-1093.

Legay, N., Grassein, F., Binet, M. N., Arnoldi, C., Personeni, E., Perigon, S., Lavorel, S. (2016). Plant species identities and fertilization influence on arbuscular mycorrhizal fungal colonization and soil bacterial activities. *Applied Soil Ecology*, 98, 132-139.

Li, J., Yang, H., Peer, W. A., Richter, G., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Krizek, B., Gaxiola, R. (2005). Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science*, 310(5745), 121-125.

Liang, B., Zhao, W., Yang, X., Zhou, J. (2013). Fate of nitrogen-15 as influenced by soil and nutrient management history in a 19-year wheat–maize experiment. *Field Crops Research*, 144, 126-134.

Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., Ma, B. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(10), 4617-4625.

Lv, S., Jiang, P., Nie, L., Chen, X., Tai, F., Wang, D., Li, Y. (2015). H⁺-pyrophosphatase from *Salicornia europaea* confers tolerance to simultaneously occurring salt stress and nitrogen deficiency in *Arabidopsis* and wheat. *Plant, cell & environment*, 38(11), 2433-2449.

Lv, S., Zhang, K., Gao, Q., Lian, L., Song, Y., Zhang, J. (2008). Overexpression of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* in cotton enhances salt tolerance and improves growth and photosynthetic performance. *Plant and Cell Physiology*, 49(8), 1150-1164.

Marulanda, A., Azcon, R., Ruiz-Lozano, J. M. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 526-533.

McLaughlin, A., Mineau, P. (1995). The impact of agricultural practices on biodiversity. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 55(3), 201-212.

Mensah, J. A., Koch, A. M., Antunes, P. M., Kiers, E. T., Hart, M., Bücking, H. (2015). High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza*, 25(7), 533-546.

Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(5), 875-885.

Mitter, B., Brader, G., Afzal, M., Compant, S., Naveed, M., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2013). Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil and bacteria. *Adv Agron*, 121, 381-445.

Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Tuleski, T., Faoro, H., Cruz, L. M., Wassem, R., Muller-Santos, M. (2012). Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. *FEMS microbiology ecology*, 80(2), 441-451.

Monteiro, R. A., Schmidt, M. A., Baura, V. A. D., Balsanelli, E., Wassem, R., Yates, M. G., Souza, E. M. D. (2008). Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(4), 932-937.

Mulvaney, R. L., Khan, S. A., & Ellsworth, T. R. (2009). Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *Journal of Environmental Quality*, 38(6), 2295-2314.

Murphy, P. J., Langridge, P., Smith, S. E. (1997). Cloning plant genes differentially during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist*, 135(2), 291-301.

Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. *PLoS One*, 9(3).

Olivares, F. L., Baldani, V. L., Reis, V. M., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 21(3), 197-200.

Olivares, J., Bedmar, E. J., Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 486-494.

ONU. *World population prospects*, the 2008 revision. Disponible em: <<http://esa.un.org/unpd/wpp2008/index.htm>>.

Ortiz, N., Armada, E., Duque, E., Roldán, A., Azcón, R. (2015). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of plant physiology*, 174, 87-96.

Paez-Valencia, J., Sanchez, J., Marsh, E., Dorneles, L. T., Santos, M. P., Sanchez, D., Façanha, A. R., Metler, J., Gaxiola, R. (2013). Enhanced H⁺-PPase Activity Improves Nitrogen Use Efficiency in Romaine Lettuce (*Lactuca sativa* cv. conquistador). *Plant Physiology*, pp-112.

Park, S., Li, J., Pittman, J. K., Berkowitz, G. A., Yang, H., Undurraga, S., Gaxiola, R. A. (2005). Up-regulation of a H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 18830-18835.

Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Auld, D. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought-and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 9(1), 88-99.

Peng, S., Biswas, J. C., Ladha, J. K., Gyaneshwar, P., Chen, Y. (2002). Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agronomy Journal*, 94(4), 925-929.

Porcel, R., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Aroca, R., Garcia, R., Ruiz-Lozano, J. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis ameliorates the optimum quantum yield of photosystem II and reduces non-photochemical quenching in rice plants subjected to salt stress. *Journal of plant physiology*, 185, 75-83.

Porcel, R., Ruiz-Lozano, J. M. (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(403), 1743-1750.

Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology*, 10(4), 393-398.

Qin, H., Gu, Q., Kuppu, S., Sun, L., Zhu, X., Mishra, N., Zhu, L. (2013). Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene AVP1 in peanut to improve drought and salt tolerance. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 345-355.

Ramos, A. C., Façanha, A. R., Feijó, J. A. (2008). Proton (H⁺) flux signature for the presymbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 178(1), 177-188.

Ramos, A. C., Façanha, A. R., Palma, L. M., Okorokov, L. A., Cruz, Z., Silva, A. G., Santos, W. O. (2011). An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(1), 79-89.

Ramos, A. C., Martins, M. A., & Façanha, A. R. (2005). Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomas de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29(2), 207-213.

Rayle, D. L., Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant physiology*, 99(4), 1271-1274.

Reinhardt, D. (2007). Programming good relations—development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(1), 98-105.

Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 435-443.

Requena, N., Breuninger, M., Franken, P., Ocón, A. (2003). Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-

ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant physiology*, 132(3), 1540-1549.

Ruiz-Lozano, J. M., Aroca, R. (2010). Host response to osmotic stresses: stomatal behaviour and water use efficiency of arbuscular mycorrhizal plants. In *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function* (pp. 239-256).

Schmidt, M. A., Souza, E. M., Baura, V., Wasseem, R., Yates, M. G., Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A. (2011). Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(3), 182-185.

Shahzad, S. M., Arif, M. S., Riaz, M., Iqbal, Z., Ashraf, M. (2013). PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. *European journal of soil biology*, 57, 27-34.

Shavrukov, Y., & Hirai, Y. (2015). Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, erv437.

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18(6-7), 287-296.

Smith II, J. L., Hare, J. D. (2004). Spectral properties, gas exchange, and water potential of leaves of glandular and non-glandular trichome types in *Datura wrightii* (Solanaceae). *Functional plant biology*, 31(3), 267-273.

Smith, S. E., Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology*, 62, 227-250.

Smith, S. E.; Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London.

Sondergaard, T. E., Schulz, A., Palmgren, M. G. (2004). Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475-2482.

Souza, A. R., De Souza, S. A., De Oliveira, M. V. V., Ferraz, T. M., Figueiredo, F. A. M. M. A., Da Silva, N. D., De Souza Filho, G. A. (2015). Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant and Soil*, 1-14.

Sze, H., Li, X., & Palmgren, M. G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11(4), 677-689.

Takahashi, K., Hayashi, K. I., Kinoshita, T. (2012). Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 159(2), 632-641.

Tian, C., Kasiborski, B., Koul, R., Lammers, P. J., Bücking, H., Shachar-Hill, Y. (2010). Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux. *Plant Physiology*, 153(3), 1175-1187.

Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677.

Vallino, M., Fiorilli, V., Bonfante, P. (2014). Rice flooding negatively impacts root branching and arbuscular mycorrhizal colonization, but not fungal viability. *Plant, cell & environment*, 37(3), 557-572.

Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 243-254.

Vargas, L., de Carvalho, T. L. G., Ferreira, P. C. G., Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Hemery, A. S. (2012). Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. *Plant and soil*, 356(1-2), 127-137.

Venancio, J. B., Catunda, M. G., Oglari, J., Rima, J. A. H., Okorokova-Facanha, A. L., Okorokov, L. A., Facanha, A. R. (2014). A vacuolar H⁺-pyrophosphatase differential activation and energy coupling integrate the responses of weeds and crops to drought stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(6), 1987-1992.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant biotechnology journal*, 5(6), 735-745.

Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant biotechnology journal*, 5(6), 735-745.

Yang, H., Zhang, X., Gaxiola, R. A., Xu, G., Peer, W. A., Murphy, A. S. (2014). Over-expression of the Arabidopsis proton-pyrophosphatase AVP1 enhances transplant survival, root mass, and fruit development under limiting phosphorus conditions. *Journal of experimental botany*, 65(12), 3045-3053.

Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., Pieterse, C. M. (2013). Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology*, 162(1), 304-318.

Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., Façanha, A. R. (2007). Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225(6), 1583-1595.

Zhan, G., Cheng, W., Liu, W., Li, Y., Ding, K., Rao, H., Wang, X. (2016). Infection, colonization and growth-promoting effects of tea plant (*Camellia sinensis* L.) by the endophytic bacterium *Herbaspirillum* sp. WT00C. *African Journal of Agricultural Research*, 11(3), 130-138.

Zhou, X. J., Liang, Y., Chen, H., Shen, S. H., Jing, Y. X. (2006). Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean. *Photosynthetica*, 44(4), 530-535.

Ziadi, N., Cambouris, A. N., Nyiraneza, J., Nolin, M. C. (2013). Across a landscape, soil texture controls the optimum rate of N fertilizer for maize production. *Field Crops Research*, 148, 78-85.