



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GABRIELLE MARQUES INÁCIO

SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR SOB
ESTRESSE: ANÁLISE COMPOSICIONAL DE HIFAS
EXTRARRADICULARES POR MICROESPECTROSCOPIA
NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE
FOURIER

CAMPINAS

2025

GABRIELLE MARQUES INÁCIO

**SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR SOB
ESTRESSE: ANÁLISE COMPOSICIONAL DE HIFAS
EXTRARRADICULARES POR
MICROESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM
TRANSFORMADA DE FOURIER**

*Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Mestra em Biologia
Vegetal.*

Orientador: PROFA. DRA. SARA ADRIÁN LÓPEZ DE ANDRADE

Co-Orientador: DRA. OHANNA MARIA MENEZES MADEIRO DA COSTA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA GABRIELLE MARQUES INÁCIO E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SARA ADRIÁN
LOPEZ DE ANDRADE

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

In1s Inácio, Gabrielle Marques, 1997-
Simbiose micorrízica arbuscular sob estresse : análise composicional de hifas extrarradiculares por microespectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier / Gabrielle Marques Inácio. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Sara Adrián López de Andrade.
Coorientador: Ohanna Maria Menezes Madeiro da Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Micorriza versículo-arbuscular. 2. Hifas. 3. Estresse abiótico. 4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. 5. Estudos *in vivo*. I. Andrade, Sara Adrián López de, 1971-. II. Costa, Ohanna Maria Menezes Madeiro da. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Arbuscular mycorrhizal symbiosis under stress : compositional analysis of extraradicular hypha by Fourier transform infrared microspectroscopy

Palavras-chave em inglês:

Vesicular-arbuscular mycorrhizas

Hyphae

Abiotic stress

Spectroscopy, Fourier transform infrared

In vivo studies

Área de concentração: Biologia Vegetal

Títuloção: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Sara Adrián López de Andrade [Orientador]

Carla Cristina Polo

Adriana Parada Dias da Silveira

Data de defesa: 03-04-2025

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 12. Consumo e produção responsáveis

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0002-2828-6998>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3121804843333966>

BANCA DA APROVAÇÃO

Profa. Dra. Sara Adrián López de Andrade

Profa. Dra. Carla Cristina Polo

Profa. Dra. Adriana Parada Dias da Silveira

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa (Pós-Graduação em Biologia Vegetal) da Unidade (Instituto de Biologia).

DEDICATÓRIA

À Gabrielle de um passado não muito distante. Ainda sinto algumas centelhas do que fui. Sou grata por sonhar e ter almejado um dia mudar o mundo com o meu trabalho. Não consegui, é claro, mas avancei um passo importante em minha jornada de autoconhecimento e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 - bolsa processo n.º 88887.711104/2022-00.

Agradeço à Profa. Sara Adrián pela orientação, ensinamentos e incentivo ao longo destes dois anos. Do mesmo modo, agradeço à Dra. Ohanna Menezes pela coorientação, parceria e conhecimentos compartilhados. Também ao Prof. Paulo Mazzafera pelos ensinamentos e pela colaboração no grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LaFiMP).

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM), sobretudo aos da linha de luz IMBUA, na qual experimentos do presente trabalho foram conduzidos, por toda assistência e suporte.

Aos companheiros do LaFiMP, em especial, Ana Isa, Vinnie, Léo, Luana, Maristela e Juci, que tanto me apoiaram e dividiram conhecimento, risadas e conselhos. Também aos técnicos do departamento de Fisiologia Vegetal, Eduardo, Camila, Victor, Jusceley e Carlos, que por diversas vezes me auxiliaram com os experimentos no laboratório e na estufa.

Aos queridos amigos Dean e Charlotte Hesterberg. Dean pela colaboração e valiosos *insights* para a pesquisa e Charlotte pelas agradáveis aulas de inglês que foram de grande proveito e crescimento pessoal.

Aos meus amigos de uma vida inteira e quem sabe até de outras, Maria, Ygor e Gustavo, que mesmo longe continuam tão presentes em minha vida. Obrigada por todos os momentos de descontração e alegria e também pelos abraços apertados, mesmo que virtualmente, nos momentos de tristeza.

À minha família, em especial às grandes mulheres que são a base da minha origem. Minha avó Marisa, por me ensinar como encarar os maiores desafios da vida com muita fé e otimismo. Às minhas tias, principalmente tia Ana Paula e minha madrinha Cíntia (*in memoriam*), que sempre me incentivaram nos estudos. Cada passo de minha trajetória acadêmica também pertence a vocês.

Aos meus pais. Minha mãe Salete, por ser uma “mãe leoa” que sempre nos educou e protegeu com muita garra. Por ser uma mulher forte, íntegra, justa e generosa que nos ensinou a batalhar com dignidade para o nosso crescimento sem deixar de olhar para o próximo com empatia. Ao meu pai, Afonso, pelos ensinamentos e reflexões. Por ser um pai amigo, sensível, divertido e por me ensinar que admirar a vida com simplicidade é sempre mais gratificante do que qualquer riqueza material. Além de tudo, por me ensinar a

conversar com as plantas para que elas não morram. Isso foi muito útil durante os meus experimentos do mestrado!

Aos meus irmãos, Vinícius, por ser um amigo e um exemplo de pessoa, por sua grande habilidade de se reinventar, sua inteligência e determinação, e Maria Theresa, minha melhor amiga, por nossas conversas, por sua companhia e por ser tão esperta e criativa, sempre me trazendo tanto orgulho.

Ao meu marido, André, simplesmente por ser meu maior companheiro, por todos os dias ao seu lado e pelos dias do resto das nossas vidas que ainda virão. Obrigada por escolher me amar e me entender, também por ter topado essa aventura louca e maravilhosa de formar a nossa própria família.

Não posso deixar de citar nos agradecimentos minha cadelinha Kira, que nesta reta final tem sido minha companhia e me ajudado a intercalar os momentos de concentração e ansiedade com leveza e amor incondicional.

Também agradeço a Deus por me mostrar sentido nos momentos de mais profunda angústia e por colocar em meu caminho tantas pessoas admiráveis que guiaram os meus passos até aqui.

RESUMO

Na associação entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), o fungo auxilia na absorção de água e nutrientes, como fósforo (P) e nitrogênio, enquanto a planta fornece ao fungo carboidratos e ácidos graxos, evidenciando a biotrofia obrigatória de FMAs. Durante a associação, os FMAs possuem estruturas intra e extrarradiculares: o micélio intrarradicular ocupa o córtex das raízes, enquanto o extrarradicular se expande pelo solo em busca de recursos como água e nutrientes minerais. Essa relação contribui para a nutrição mineral das plantas, formação e estabilidade dos agregados do solo, aumento da tolerância vegetal a estresses ambientais e para o sequestro de carbono no solo. Contudo, o efeito de estresses ambientais aos FMAs ainda é pouco conhecido, sendo a maior parte dos estudos centrados no parceiro vegetal. Este trabalho buscou analisar mudanças no perfil composicional de hifas extrarradiculares (HE) do FMA *Rhizophagus irregularis* associado a *Urochloa decumbens* por microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR). Para isto, foram inicialmente desenvolvidos protótipos de um sistema porta-amostras que permitisse o estabelecimento da associação com o parceiro vegetal em um ambiente compacto para posterior análise das HE por μ -FTIR. Em um segundo experimento, foram estudadas as respostas das HE do FMA ao estresse por variações na concentração de manganês (Mn) (100 μ M) associada à duas concentrações de P: 10 μ M e 100 μ M, utilizando *Urochloa decumbens* como planta hospedeira. Em um terceiro experimento, plantas de *U. decumbens* associadas ou não a dois diferentes isolados de *R. irregularis* foram submetidas a dois regimes de sombreamento, redução de 70 (luz média) e 95% (luz baixa) da radiação fotossinteticamente ativa, e comparadas a um grupo controle (luz plena), a fim de investigar os efeitos do estresse luminoso no perfil composicional das HE e as respostas fisiológicas na planta hospedeira. Quanto ao desenvolvimento dos sistemas porta-amostras, foram avaliados o isolamento físico das HE das raízes, o crescimento das HE sobre substratos de ouro, usados como suporte de amostras em análises μ -FTIR no modo reflectância e a viabilidade das plantas. Não foi possível demonstrar a presença de HE de FMAs sobre os sistemas porta-amostra desenvolvidos, mesmo com a presença de colonização intrarradicular nas plantas utilizadas nos sistemas. Foram encontradas hifas de fungos não micorrízicos arbusculares (não-MA) em quase todos os sistemas, evidenciando sua contaminação. Então, foram comparados os perfis composicionais de HE de FMA pré-coletadas e fungos não-MA do tipo *dark septate endophyte* crescendo sobre os sistemas desenvolvidos. As análises das HE por μ -FTIR permitiram detectar mudanças em grupos moleculares como lipídios, proteínas e carboidratos, que resultaram em padrões composicionais característicos para cada grupo de fungo estudado. As imagens hiperespectrais indicaram distribuição homogênea de

carboidratos ao longo das HE do FMA, sugerindo que nesta região espectral ocorrem principalmente compostos relacionados à parede celular do fungo. Quanto ao segundo bloco experimental, a concentração de 100 μ M reduziu a extensão do micélio externo do FMA, mas somente combinada à concentração de 100 μ M P. Já no terceiro e último bloco experimental, o estresse por sombreamento reduziu a produção de biomassa da planta independentemente do status micorrízico. Contudo, a simbiose favoreceu a produção de perfilhos e o acúmulo de P nas folhas mesmo sob condição de baixa luz. O sombreamento reduziu a presença de arbúsculos e vesículas no córtex da raiz, mas sem impacto significativo na frequência de colonização ou extensão do micélio extrarradicular. As HE dos dois isolados de *R. irregularis* apresentaram distintos padrões espectrais por μ -FTIR, permitindo a sua diferenciação. Quanto aos padrões de distribuição de compostos nas HE, proteínas em geral ocuparam regiões opostas aos lipídios. Nas hifas de plantas expostas à luz baixa foi possível perceber a distribuição de carboidratos concentrada nas regiões centrais e apicais da hifa. Já para as demais condições de luminosidade, a distribuição de carboidratos ocorreu de maneira homogênea e contínua ao longo das hifas. Este trabalho utilizou de forma inovadora a μ -FTIR para a análise da simbiose micorrízica arbuscular com ênfase nas hifas extrarradiculares do FMA. Os resultados possibilitaram validar respostas ainda pouco conhecidas acerca da fisiologia de FMA submetidos ao estresse ambiental.

Palavras-chave: simbiose micorrízica arbuscular; hifa extrarradicular; estresse ambiental; análise por μ -FTIR; cultivo *in vivo* de FMA.

ABSTRACT

In the association between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), the fungus assists in the absorption of water and nutrients, such as phosphorus (P) and nitrogen, while the plant provides the fungus with carbohydrates and fatty acids, demonstrating the obligate biotrophy of AMF. In symbiosis, AMF have both intra- and extraradical structures: the intraradical mycelium colonizes the root cortex, while the extraradical mycelium extends into the soil in search of resources such as water and mineral nutrients. This association contributes to plant mineral nutrition, soil aggregate formation and stability, enhanced plant tolerance to environmental stresses, and soil carbon sequestration. However, the effects of environmental stresses on AMF remain poorly understood, with most studies focusing on the plant partner. This study aimed to analyze changes in the compositional profile of extraradical hyphae (EH) of the AMF *Rhizophagus irregularis* associated with *Urochloa decumbens* using Fourier-transform infrared microspectroscopy (μ -FTIR). For this purpose, prototypes of a sample holder system were initially developed to enable the establishment of the symbiotic association with the plant partner in a compact environment, followed by EH analysis via μ -FTIR. In a second experiment, the responses of AMF EH to stress induced by variations in manganese (Mn) concentration (100 μ M) combined with two P concentrations (10 μ M and 100 μ M) were investigated, using *Urochloa decumbens* as the host plant. In a third experiment, *U. decumbens* plants, either colonized or not by two *R. irregularis* isolates, were subjected to two shading regimes — 70% (medium light) and 95% (low light) reduction in photosynthetically active radiation — and compared to a control group (full light). This was done to assess the effects of light stress on the compositional profile of EH and the physiological responses of the host plant. Regarding the development of the sample holder systems, the physical isolation of EH from roots, the growth of EH on gold substrates (used as sample supports in reflectance-mode μ -FTIR analyses), and plant viability were evaluated. The presence of AMF EH on the developed sample holders could not be confirmed, despite intraradical colonization in the plants used in the systems. Hyphae from non-arbuscular mycorrhizal (non-AM) fungi were found in nearly all systems, indicating contamination. Consequently, the compositional profiles of pre-collected AMF EH and dark septate endophyte-type non-AM fungi growing in the developed systems were compared. μ -FTIR analyses of EH detected changes in molecular groups such as lipids, proteins, and carbohydrates, resulting in distinct compositional patterns for each fungal group studied. Hyperspectral imaging revealed homogeneous carbohydrate distribution in AMF EH, suggesting that this spectral region primarily contains compounds related to the fungal cell wall. In the second experimental block, the 100 μ M Mn concentration reduced the extent of AMF external mycelium, but only when combined with 100 μ M P. In the third and final

experimental block, shading stress reduced plant biomass production regardless of mycorrhizal status. However, symbiosis promoted tiller production and P accumulation in leaves even under low-light conditions. Shading decreased the presence of arbuscules and vesicles in the root cortex but did not significantly affect colonization frequency or extraradical mycelium extent. The EH of the two *R. irregularis* isolates exhibited distinct spectral patterns in μ -FTIR, allowing their differentiation. Regarding compound distribution in EH, proteins generally occupied regions opposite to lipids. In hyphae from plants exposed to low light, carbohydrates were concentrated in the central and apical regions, whereas under other light conditions, carbohydrate distribution was more uniform and continuous along the hyphae. This study innovatively applied μ -FTIR to analyze arbuscular mycorrhizal symbiosis, with an emphasis on AMF extraradical hyphae. The results helped validate poorly understood responses regarding the physiology of AMF under environmental stress.

Keywords: arbuscular mycorrhizal association; extraradicular hyphae; environmental stress; μ -FTIR analysis; *in vivo* cultivation of AMF.

SUMÁRIO

1	Capítulo 1. Introdução	16
1.1	Fungos micorrízicos arbusculares	16
1.2	Microespectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	20
1.3	Objetivos	21
1.3.1	Objetivo geral	22
1.3.2	Objetivos específicos	22
1.4	Justificativa	22
2	Capítulo 2. Proposta de sistema para estudo do micélio extrarradicular de fungo micorrízico arbuscular e análises de hifas fúngicas por μ -FTIR	24
2.1	Introdução	26
2.2	Materiais e métodos	28
2.2.1	Material biológico e condições de crescimento das plantas hospedeiras	28
2.2.2	Montagem dos sistemas	28
2.2.3	Avaliação da colonização micorrízica intrarradicular	30
2.2.4	Análise de hifas por μ -FTIR	30
2.3	Resultados	31
2.3.1	Viabilidade e eficiência dos protótipos	31
2.3.2	Colonização micorrízica das raízes	33
2.3.3	Crescimento de hifas sobre substratos de μ -FTIR e outras superfícies internas das microplacas	35
2.3.4	Análise composicional de hifas por μ -FTIR	38
2.4	Discussão	47
2.4.1	Validação dos protótipos do sistema porta-amostras	47
2.4.2	Análises μ -FTIR: estrutura e composição química das hifas	50

2.5	Conclusão	53
3	Capítulo 3. Análise de hifas extrarradiculares de FMA frente à exposição ao Mn e variações na concentração de P durante a associação micorrízico arbuscular	54
3.1	Introdução	56
3.2	Materiais e métodos	58
3.2.1	Delineamento experimental	58
3.2.2	Materiais biológicos e condições de crescimento	58
3.2.3	Determinação da biomassa e das concentrações de P e Mn na parte aérea vegetal	59
3.2.4	Biomassa da raiz, parâmetros morfológicos e avaliação da colonização micorrízica	59
3.2.5	Determinação do comprimento do micélio extrarradicular no substrato	59
3.2.6	Obtenção de hifas extrarradiculares para análises por μ -FTIR	60
3.2.7	Análises por μ -FTIR de hifas extrarradiculares de FMA	60
3.2.8	Análise Estatística	61
3.3	Resultados	61
3.3.1	Colonização micorrízica e características biométricas de raiz e parte aérea	61
3.3.2	Concentração e acúmulo de P e Mn na parte aérea	63
3.3.3	Análises de correlação de Pearson	64
3.3.4	Composição química de hifas extrarradiculares por μ -FTIR	65
3.4	Discussão	72
3.4.1	Influência das disponibilidades de Mn e P no crescimento intra e extrarradicular do FMA	72
3.4.2	Acúmulo de Mn na parte aérea e aumento do diâmetro médio das raízes	74
3.4.3	Análise composicional das hifas extrarradiculares por μ -FTIR	75
3.5	Conclusão	77
4	Capítulo 4. Efeitos do sombreamento na associação micorrízica arbuscular em <i>Urochloa decumbens</i> e análise composicional das hifas extrarradiculares por μ -FTIR	78
4.1	Introdução	80

4.2	Materiais e métodos	82
4.2.1	Delineamento experimental	82
4.2.2	Materiais biológicos e condições de crescimento	83
4.2.3	Avaliação de parâmetros biométricos e determinação das concentrações de nutrientes	84
4.2.4	Determinação da concentração de açúcares solúveis e amido em folhas e raízes	85
4.2.5	Concentração de proteínas solúveis totais e atividade de invertases na raiz	86
4.2.6	Determinação da colonização micorrízica e comprimento do micélio externo total	86
4.2.7	Obtenção de hifas extrarradiculares para análises por μ -FTIR	87
4.2.8	Análise estatística	88
4.3	Resultados	88
4.3.1	Parâmetros fotoquímicos, índices de pigmentos e balanço de nitrogênio	88
4.3.2	Produção de biomassa vegetal	91
4.3.3	Concentração e conteúdo de nutrientes da parte aérea	94
4.3.4	Concentrações de glicose, sacarose e amido vegetal	96
4.3.5	Atividade das invertases ácida e alcalina nas raízes e conteúdo de proteínas solúveis totais	98
4.3.6	Colonização micorrízica intrarradicular e comprimento do micélio externo total	98
4.3.7	Análise das hifas extrarradiculares por μ -FTIR	101
4.4	Discussão	109
4.4.1	Pigmentos foliares e atividade fotossintética em plantas micorrizadas sob sombreamento	109
4.4.2	Efeitos da simbiose micorrízica arbuscular na produção de biomassa vegetal e estado nutricional de plantas sob sombreamento	111
4.4.3	Alterações na alocação de carboidratos no hospedeiro vegetal durante o sombreamento	113
4.4.4	Respostas do parceiro fúngico em situação de estresse por sombreamento da planta hospedeira	116

4.5	Conclusão	120
5	Referências bibliográficas	122
6	Anexos	148

Capítulo 1. Introdução

1.1 Fungos micorrízicos arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), pertencentes ao subfilo Glomeromycotina, incluído ao filo Mucoromycota, são conhecidos por sua associação mutualística com plantas (Spatafora et al., 2017). Registros fósseis indicam que essa associação remonta há mais de 400 milhões de anos, tendo estruturas fúngicas semelhantes a arbúsculos sido encontradas em rizomas de plantas terrestres ancestrais na formação geológica Cherte de Rhynie (Trewin e Rice, 2004; Strullu-Derrien et al., 2018). A simbiose micorrízica arbuscular (MA) é considerada uma das associações mais antigas entre plantas e fungos, tendo desempenhado um papel crucial na adaptação das plantas ao meio terrestre (Tedersoo et al., 2020).

Os FMAs estabelecem associação com cerca de 78% das espécies de plantas vasculares e embora a maioria dos FMAs seja generalista, colonizando diversas espécies vegetais, alguns mostram certo nível de especificidade, que é influenciada por fatores ecológicos, ambientais, moleculares e genéticos (Smith e Read, 2008). Nesta simbiose, o fungo melhora a absorção de água e nutrientes do solo como fósforo (P) e nitrogênio (N) para a planta, enquanto a planta fornece carboidratos e ácidos graxos para o fungo (Smith e Read, 2008; Jiang et al., 2017).

Durante a simbiose, os FMAs formam estruturas tanto intra quanto extrarradiculares, sendo suas hifas cenocíticas, ou seja, asseptadas e com a presença de muitos núcleos compartilhando um citoplasma em comum (Smith e Read, 2008). O micélio intrarradicular (MIR) é composto por hifas localizadas dentro do córtex radicular, enquanto o micélio extrarradicular (MER) é formado por hifas que se estendem pelo solo em busca de nutrientes e água (Parniske, 2008) (Fig. 1.1). A propagação da simbiose ocorre através de glomerosporos, fragmentos de raízes colonizadas ou pelo contato com hifas do MER de outras raízes no mesmo ambiente, formando redes micorrízicas conectadas entre si (Smith e Read, 2008; Wipf et al., 2019).

Os glomerosporos germinam no solo utilizando suas reservas de carboidratos e lipídios para o crescimento inicial da hifa, que precisa se conectar com o hospedeiro por meio de moléculas sinalizadoras exsudadas pela planta, como as estrigolactonas (Czarnecki et al., 2013; Schmitz e Harrison, 2014). Na ausência dessa sinalização, o crescimento da hifa é interrompido até encontrar um possível hospedeiro (Giovannetti et al., 1993; Bago et al., 2000; Smith e Read, 2008). Em condições naturais os FMAs só completam seu ciclo de vida em simbiose com a planta hospedeira, sendo estritamente dependentes deste parceiro.

As hifas penetram as raízes por meio de apressórios e se estendem pelo córtex sem atravessar o periciclo, devido a sua incapacidade de ultrapassar a endoderme suberizada (Smith e Read, 2008). Hifas especializadas formam os arbúsculos, estruturas altamente ramificadas de formato similar a uma árvore, que facilitam as trocas entre os simbiontes (Parniske, 2008) (Fig. 1.2). Existem dois tipos de morfologia do MIR: o tipo Arum, com arbúsculos intracelulares e hifas intercelulares, e o tipo Paris, caracterizado por hifas enoveladas que se desenvolvem de célula a célula (Gallaud, 1905; Smith e Read, 2008).

Os arbúsculos não causam danos às células hospedeiras, permanecendo envoltos pela membrana plasmática da planta, agora chamada de membrana periarbuscular. O espaço entre essa membrana e a parede celular do fungo é o espaço periarbuscular, onde ocorrem as trocas entre os parceiros simbiontes (Smith e Read, 2008). Além disso, os FMA podem formar vesículas no MIR, que armazenam principalmente lipídios e glicogênio (Roth e Paszkowski, 2017; Roth et al., 2019).

As hifas do MER podem apresentar diâmetro de 2 a 25 µm e possuem taxas de crescimento variáveis (York et al., 2016; Serghi et al., 2021). A formação de novos glomerosporos ocorre nas extremidades das hifas extrarradiculares e após sua maturação eles são liberados no solo para colonizar novas raízes (Smith e Read, 2008). Embora o genoma dos FMA seja geralmente haplóide, sua diversidade genética e sucesso evolutivo sugerem um ciclo sexual críptico ou parassexual, com troca de alelos entre indivíduos (Riley e Corradi, 2013). Além disso, os FMAs possuem genes para meiose e reprodução sexuada, podendo formar anastomose, que pode resultar na troca de núcleos, semelhante à primeira etapa da reprodução sexual de outros fungos (Corradi e Lildhar, 2012; Riley et al., 2014; Kamel et al., 2016; Ropars et al., 2016).

As hifas extrarradiculares exploram o solo em busca de nutrientes além da capacidade das raízes, criando um *continuum* planta-fungo-solo, onde o FMA atua como uma ponte entre o solo e a planta (Smith e Read, 2008). A absorção de P pelos FMA ocorre através de transportadores específicos e ele é armazenado na forma de polifosfato (polyP), sendo translocado para os arbúsculos e liberado no espaço periarbuscular para a planta hospedeira (Ezawa e Saito, 2018). Como um nutriente essencial, o P é crucial para processos metabólicos nas plantas, incluindo respiração, fotossíntese e biossíntese de moléculas (Lambers, 2022). Os FMA absorvem P inorgânico (Pi) na forma de íons fosfato, ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), através de transportadores simporte H^+/Pi de alta afinidade (PHO84), impulsionados por H^+ -ATPases, ou por transportadores simporte Na^+/Pi (PHO89) (Ferrol et al., 2019). Uma vez absorvido pelas hifas extrarradiculares, o Pi será transformado em ATP durante a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. O ATP é então utilizado para a síntese de cadeias de polyP, o que ocorre nos vacúolos pelo complexo vacuolar de transportador chaperona (VTC) (Cox et al., 1980; Ezawa et al., 2001; Ohtomo e Saito, 2005;

Hijikata et al., 2010). O acúmulo de polyP nas hifas permite ao FMA transportar o P por longas distâncias por meio do transporte vacuolar, encaminhando o nutriente para o MIR até os arbúsculos, onde pode ser despolimerizado em Pi e repassado para o hospedeiro através de transportadores ainda não conhecidos na membrana periarbuscular (Ezawa e Saito, 2018).

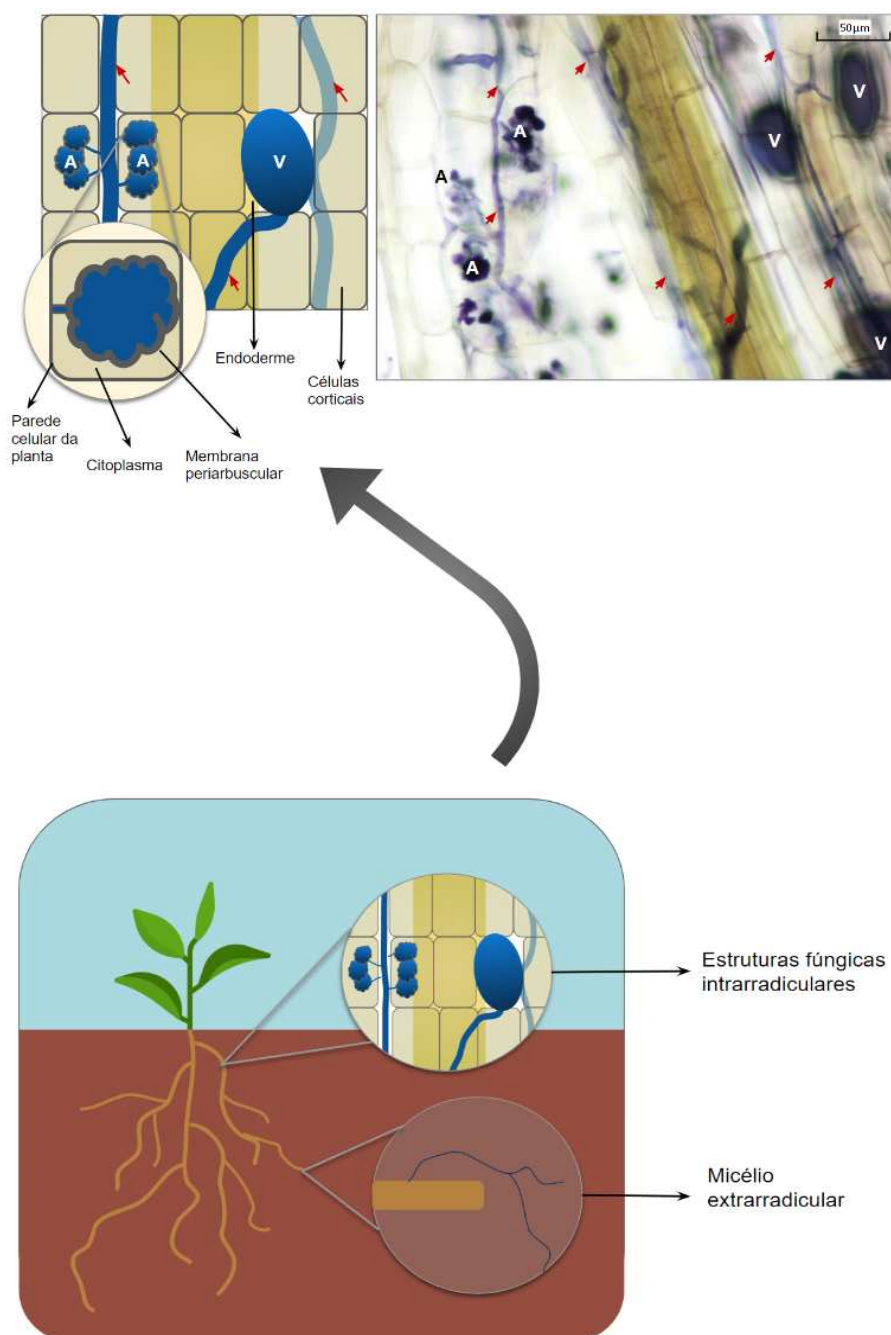


Figura 1.1 Morfologia geral de FMA. Os fungos micorrízicos arbusculares possuem um MER que se localiza externamente à raiz ocupando o solo de forma a absorver nutrientes e água e transportados ao MIR, que coloniza a região do córtex radicular. Setas vermelhas indicam hifas intraradiculares, A: arbúsculos e V: vesículas.

A molécula de polyP é uma cadeia linear, com de três a centenas de resíduos de Pi, ligados por ligações fosfoanidrido (Kikuchi et al., 2014; Ferrol et al., 2019). O fungo adquire Pi e cátions como Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ por absorção através de proteínas transportadoras, sendo que esses cátions possuem um papel importante na neutralização das cargas negativas do polyP (Kikuchi et al., 2014; Kikuchi et al., 2016). O aminoácido arginina também pode neutralizar as cargas negativas do polyP (Bago et al., 2002; Kikuchi et al., 2014). Uma vez neutralizado, o polyP pode se movimentar, sendo translocado inclusive a longas distâncias até as hifas do MIR e para os arbúsculos (Kikuchi et al., 2014). A translocação de polyP depende dos fluxos de água mediados por aquaporinas fúngicas presentes nas membranas dos vacúolos das hifas (Ezawa e Saito, 2018; Ferrol et al., 2019).

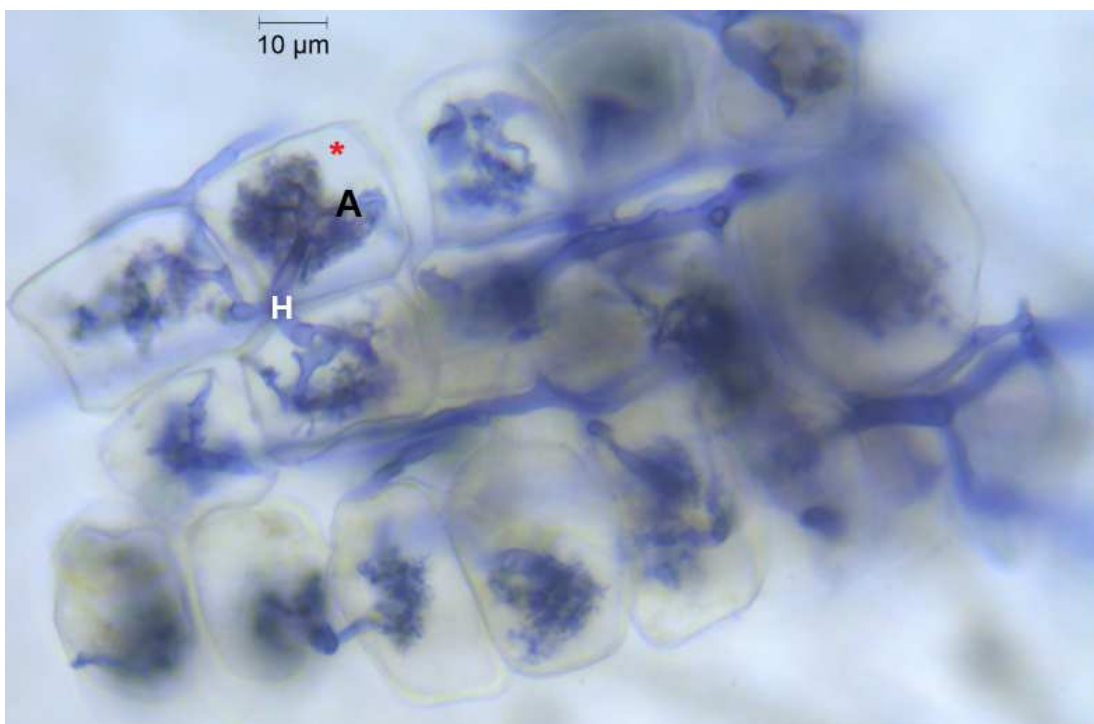


Figura 1.2 Células corticais de raiz de *Urochloa decumbens* colonizadas por *Rhizophagus irregularis*. É possível observar a presença de arbúsculos (A), posicionados lateralmente às hifas intraradicales (H), adentrando as células do córtex (*) da raiz hospedeira.

Os FMAs são organismos biotróficos obrigatórios, ou seja, dependem exclusivamente dos produtos da fotossíntese da planta para obter carbono (Salmeron-Santiago et al., 2021). A associação com FMAs pode modificar a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose e na síntese de lipídios, influenciando profundamente as relações fonte-dreno da planta (Doidy et al., 2012; Salmeron-Santiago et al., 2021). Como o FMA recebe carbono principalmente na forma de glicose, enzimas como a sacarose sintase e as invertases (INV), essenciais para o transporte e quebra da sacarose, podem ser induzidas durante a simbiose (Ruan et al., 2010; Salmeron-Santiago et

al., 2021). A planta hospedeira pode direcionar de 4% a 25% de seu carbono fotoassimilado ao FMA (Hobbie, 2006; Wipf et al., 2019). Os FMAs são auxotróficos para ácidos graxos e também recebem lipídios da planta, sendo esses metabolizados essencialmente para a síntese de membranas e compostos energéticos para armazenamento (Luginbühl et al., 2017).

A simbiose MA tem um papel ecológico crucial, contribuindo para a nutrição mineral das plantas, a formação e estabilização de agregados do solo e para o aumento da tolerância vegetal à estressores bióticos e abióticos (Degens et al., 1996; Evelin et al., 2009; Miransari, 2011; Vos et al., 2012; Lenoir et al., 2016; Diagne et al., 2020). Também é relevante ressaltar seu papel na mobilização de nutrientes e estocagem de carbono no solo, especialmente diante das crescentes ameaças ambientais ocasionadas pelas mudanças climáticas (Hawkins et al., 2023). Com a previsão da duplicação da demanda por alimentos até 2050, o uso de FMA como biofertilizantes surge como uma alternativa promissora para a alta demanda de fertilizantes fosfatados e a restauração de áreas degradadas (Igiehon e Babalola, 2017; Rodriguez e Sanders, 2015). Os FMA têm um papel vital na economia verde, impactando sistemas agrícolas, restauração de áreas degradadas e produção de mudas (Kalamulla et al., 2022). Levando em consideração a importância biotecnológica e o seu papel ecológico, é necessário haver maior empenho na busca por tecnologias inovadoras para o estudo desses fungos. Trabalhos que têm como ênfase as respostas de FMA a situações de estresse ainda são escassos, indicando lacunas no conhecimento sobre sua fisiologia.

1.2 Microespectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A microespectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (μ -FTIR), do termo em inglês *Fourier Transform InfraRed*, é uma técnica avançada que permite a aquisição em tempo real de uma ampla gama de informações sobre a composição química de diversos materiais, incluindo amostras biológicas (Movasaghi et al., 2008; Baker et al., 2014). Esta técnica baseia-se na capacidade das moléculas de absorver luz na região do infravermelho (IR) do espectro eletromagnético, resultando em vibrações moleculares características (Loutherback et al., 2016). Essas vibrações refletem as ligações químicas presentes absorvendo luz IR em diferentes números de onda (onde o número de onda [cm^{-1}] é inversamente proporcional ao comprimento de onda [nm]), formando bandas específicas de absorção que podem ser atribuídas a grupos químicos distintos (Griffiths, 1983).

A μ -FTIR utiliza luz IR para interagir com as amostras e provocar mudanças nos modos vibracionais das ligações moleculares. Essas mudanças na absorção de IR são detectadas e analisadas com a ajuda de um interferômetro, permitindo a identificação dos

grupos funcionais e da composição molecular da amostra (Loutherback et al., 2015; Loutherback et al., 2016). As amostras são posicionadas em substratos transparentes ao feixe de IR permitindo a passagem da luz infravermelha com a mínima absorção, ou em substratos reflexivos em configurações específicas que podem auxiliar na obtenção de dados relevantes. O uso adequado dos substratos é crucial para minimizar interferências e obter espectros de alta qualidade.

A μ -FTIR se destaca como uma ferramenta poderosa devido à sua natureza não destrutiva e à ausência de necessidade de marcadores químicos, o que permite a análise da estrutura e função de macromoléculas em sistemas biológicos complexos, como células e tecidos (Baker et al., 2014). Exemplos de aplicações incluem a avaliação da abundância de colágeno, carbonatos e fosfatos em cartilagens e ossos, a caracterização da distribuição espacial de colágeno e proteoglicanos na cartilagem auricular e a identificação de alterações estruturais no DNA de tecidos da próstata para prever o estado metastático de tumores (Baker et al., 2014).

Em estudo com fungos, a μ -FTIR possibilitou a geração de imagens hiperespectrais que revelaram mudanças na composição celular em resposta a estresses como variações de temperatura e pH em *Aspergillus nidulans*, *Neurospora* sp. e *Rhizopus* sp., além de identificar diferenças sutis entre células mutantes e selvagens de *Aspergillus nidulans* (Szeghalmi et al., 2007). No caso da produtividade lipídica de *Mucor circinelloides*, a técnica revelou a formação e o acúmulo de lipídios nas diferentes formas celulares do fungo, destacando uma maior presença de lipídios em células leveduriformes quando em comparação com hifas do mesmo fungo (Shapaval et al., 2023). Essa análise também permitiu correlacionar a morfologia celular com a distribuição de lipídios e proteínas, fornecendo informações detalhadas sobre a lipogênese em diferentes escalas, desde células inteiras até estruturas subcelulares como gotículas lipídicas (Shapaval et al., 2023).

A μ -FTIR também foi empregada para investigar o papel dos FMA na mitigação de danos causados por rejeitos de minério de ferro (Li et al., 2023). As imagens hiperespectrais demonstraram a presença de lipídios, proteínas e carboidratos derivados dos FMAs associados a minerais de ferro e sílica (Li et al., 2023). Os resultados evidenciaram a importância dos FMAs na formação e estabilização da matéria orgânica e na promoção do intemperismo mineral, o que contribui para a formação de solos e para recuperação de áreas degradadas (Li et al., 2023). Esses exemplos destacam o potencial da técnica de μ -FTIR para elucidar detalhes sobre processos metabólicos em sistemas biológicos complexos, especialmente em resposta a condições ambientais variáveis.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi analisar a simbiose micorrízica arbuscular sob estresse com ênfase nas respostas do parceiro fúngico.

1.3.2 Objetivos específicos

- I. Caracterizar por meio de μ -FTIR as alterações em hifas extrarradiculares de FMAs causadas por estressores ambientais como exposição ao Mn (100 μ M) e variações na concentração de P (10 e 100 μ M) em um ambiente de déficit nutricional (sem adição de nutrientes), bem como a exposição do hospedeiro vegetal ao sombreamento com redução da RFA em aproximadamente 70 e 90%.
- II. Diferenciar, utilizando a μ -FTIR, hifas extrarradiculares de FMAs de dois isolados de *Rhizophagus irregularis* em condições de estresse por sombreamento, enfatizando as possíveis mudanças na composição geral de lipídios, proteínas e carboidratos.
- III. Avaliar a influência da micorriza arbuscular em características fisiológicas e bioquímicas de plantas de *Urochloa decumbens* (Stapf) R. Webster colonizadas por dois isolados de *R. irregularis* sob condições de sombreamento.
- IV. Desenvolver um protótipo de sistema porta-amostras para uso na linha de luz IMBUIA do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) para análises por μ -FTIR de hifas extrarradiculares associadas à raiz da planta hospedeira.
- V. Avaliar o perfil composicional de hifas extrarradiculares de FMA por meio de imagens hiperespectrais utilizando a técnica de μ -FTIR.
- VI. Diferenciar o perfil composicional de hifas extrarradiculares de FMA de hifas de fungos não-MA, utilizando dados gerados pela μ -FTIR.

1.4 Justificativa

Tradicionalmente, as pesquisas sobre associações micorrízicas têm se concentrado predominantemente na planta hospedeira, enquanto as respostas dos fungos micorrízicos em geral recebem pouca atenção. Essa lacuna é particularmente relevante dado que a disponibilidade de P nos solos é frequentemente limitada, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Nesses contextos, a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes acaba sendo necessária para sustentar a produção agrícola (Sanchez et al., 1992; Ros et al., 2020). A importância dos FMA na aquisição de P e a necessidade de entender melhor a fisiologia desses fungos justificam um enfoque mais detalhado em suas respostas a condições de estresse.

A pesquisa sobre a fisiologia dos FMA sob estresse é limitada possivelmente devido às dificuldades associadas ao cultivo *in vitro* desses organismos, que são biotróficos obrigatórios e desenvolvem-se em ambientes de difícil acesso, como o interior das raízes e através do solo. A maioria dos estudos existentes enfatiza a variação da colonização intrarradicular em resposta ao estresse, enquanto as respostas fisiológicas mais amplas dos FMA ainda não foram suficientemente exploradas (Bennett e Groten, 2022; Kakouridis et al., 2022; Oliveira et al., 2024).

Nesse sentido, o estudo das alterações composicionais em hifas extrarradiculares de FMA sob diferentes condições de estresse pode fornecer significativamente novos *insights* para o entendimento dessas interações. Os fatores estressores selecionados para investigar a interação planta-FMA incluem exposição direta ao Mn e a exposição do hospedeiro vegetal a tratamentos de sombreamento. Além disso, essa análise também leva em conta características do hospedeiro, buscando correlacionar a fisiologia da planta com as mudanças nas hifas extrarradiculares dos FMAs.

A técnica de μ -FTIR é particularmente relevante para este estudo, pois permite a caracterização detalhada da composição química das amostras sem a necessidade de corantes ou marcadores, o que minimiza artefatos e possibilita a análise refinada das mudanças composicionais. Além disso, a μ -FTIR pode revelar a distribuição espacial de compostos específicos e comparar suas concentrações em diferentes condições experimentais.

O LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron), localizado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), oferece infraestrutura científica avançada, incluindo o acelerador de partículas Sirius. Este centro de excelência internacional, que possui linhas de luz síncrotron de quarta geração, permite a observação física e química de estruturas de materiais e sistemas biológicos. A linha de luz IMBUA do Sirius é dedicada à microscopia IR limitada por difração (IMBUA-micro) e à imagem espectral IR em nanoescala (IMBUA-nano), cobrindo a faixa do IR médio (de 4000 a 400 cm^{-1}). A integração da microbiologia do solo com a técnica μ -FTIR representa uma oportunidade única para investigar as interações microbianas e as mudanças composicionais em níveis moleculares, um campo ainda pouco explorado. Além disso, o desenvolvimento de protótipos para o estudo futuro de hifas extrarradiculares *in vivo* contribuirá para o aprimoramento de porta-amostras biológicas, beneficiando futuras pesquisas na linha de luz.

Finalmente, a abordagem proposta nesta dissertação visa ampliar o conhecimento sobre os efeitos de estresses ambientais na interação planta-FMA. A estrutura do texto foi dividida em quatro partes – uma de introdução geral (presente capítulo) e três capítulos distintos para cada bloco experimental – de forma a segmentar as linhas experimentais e o fluxo de raciocínio ao longo do trabalho.

Capítulo 2. Proposta de sistema para estudo do micélio extrarradicular de fungo micorrízico arbuscular e análises de hifas fúngicas por μ -FTIR

Proposal of a system for studying the extraradicular mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi and analysis of fungal hyphae by μ -FTIR

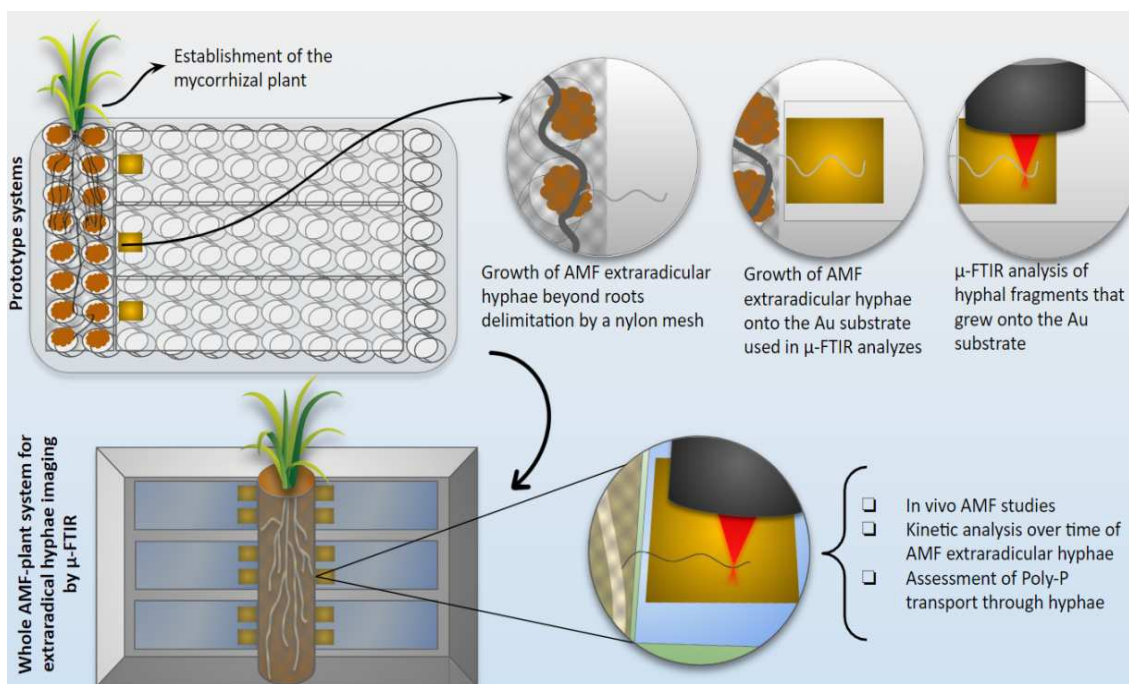


Figura 2.1 Resumo gráfico do capítulo. Esquema da elaboração de sistemas protótipos para o desenvolvimento de hifas de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em associação com uma planta hospedeira. Foram avaliados fatores como a viabilidade da planta micorrizada, o crescimento de hifas extrarradulares através de uma malha de náilon, que delimitou a posição das raízes e a possibilidade do crescimento de hifas sobre substratos de ouro (Au), utilizados nas análises por μ -FTIR. Também foram realizadas análises de hifas fúngicas pela técnica de μ -FTIR. Essas etapas resultaram na formulação de metodologias que oferecem suporte para o desenvolvimento futuro de dispositivos porta-amostras voltados ao estudo de fungos filamentosos por técnicas aplicadas em linhas de luz.

Resumo

A técnica de microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR) permite a obtenção de espectros com alta resolução espacial e temporal, possibilitando a identificação de componentes químicos em materiais biológicos. Dispositivos microfluídicos são amplamente utilizados para o estudo de amostras biológicas vivas por μ -FTIR, pois preservam processos fisiológicos naturais das células e minimizam interferências nas análises. Neste capítulo, foram desenvolvidos protótipos de sistemas para o estudo, por μ -FTIR, de hifas extrarradulares de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em associação com plantas hospedeiras vivas. Foram avaliados fatores como o isolamento

físico do micélio extrarradicular em relação às raízes da planta hospedeira, o crescimento das hifas sobre substratos de ouro (Au), utilizados como suporte de amostras no modo reflectância do μ -FTIR e a viabilidade da planta micorrizada no sistema. A colonização por FMA no córtex radicular foi confirmada antes e após a montagem, dia inicial, e análise, dia final, dos sistemas. No entanto, não foram detectadas hifas extrarradiculares sobre substratos de Au ou sobre as microplacas utilizadas. Por outro lado, fungos não micorrízicos, possivelmente pertencentes do grupo dark septate endophyte (DSE), colonizaram as raízes e cresceram sobre os substratos de Au e no interior das microplacas. A análise espectral revelou a presença de proteínas, lipídios e carboidratos em ambos os fungos, mas com diferenças no perfil espectral. Além disso, a presença de melanina foi detectada nos espectros de fungos não-MA, o que é compatível com a organização da parede celular de ascomicetos. Já nas hifas de FMA, a distribuição homogênea de carboidratos sugere sua predominância na composição da parede celular. Foi proposto um modelo esquemático para a organização intracelular e o arranjo espacial da parede celular das hifas extrarradiculares de FMA, destacando a presença de quitina, glucanos e lipoquitooligossacarídeos (Myc-LCOs), compostos essenciais para sua estrutura e fisiologia.

Palavras-chave: dispositivos porta-amostras para μ -FTIR; hifas extrarradiculares de FMA; fungos dark septate endophyte; parede celular fúngica; biologia celular de fungos

Abstract

Fourier transform infrared microspectroscopy (μ -FTIR) technique allows obtaining spectra with high spatial and temporal resolution, enabling the identification of chemical components in biological materials. Microfluidic devices are widely used for the study of live biological samples by μ -FTIR, as they preserve natural physiological processes of cells and minimize interference in the analyses. In this chapter, prototypes of systems were developed for the study, by μ -FTIR, of extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in association with live host plants. Factors such as the physical isolation of the extraradical mycelium in relation to the roots of the host plant, the growth of the hyphae on gold (Au) substrates, used as sample support in the reflectance mode of μ -FTIR, and the viability of the mycorrhizal plant in the system were evaluated. The colonization by AMF in the root cortex was confirmed before and after the assembly and analysis of the systems. However, no extraradical hyphae were detected on Au substrates or in the microplates used. On the other hand, non-mycorrhizal fungi, possibly belonging to the dark septate endophyte (DSE) group, colonized the roots and grew both on Au substrates and inside the microplates. Spectral analysis revealed the presence of proteins, lipids and carbohydrates in both fungi. In

addition, the presence of melanin was detected in the spectra of non-AM fungi, compatible with the cellular organization of ascomycetes. In the AMF hyphae, the homogeneous distribution of carbohydrates suggests their predominance in the composition of the cell wall. A schematic model for the intracellular organization and spatial arrangement of the cell wall of AMF extraradical hyphae was proposed, highlighting the presence of chitin, glucans and lipochitooligosaccharides (Myc-LCOs), compounds essential for their structure and physiology.

Keywords: μ -FTIR sample holders; AMF extraradical hyphae; dark septate endophyte fungi; fungal cell wall; fungal cell biology

2.1 Introdução

A técnica de microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR) revolucionou a análise composicional de materiais biológicos, pois dispensa o uso de marcadores químicos, permitindo a preservação de estruturas moleculares e a reutilização do material em análises subsequentes (Loutherback et al., 2015). O μ -FTIR fornece espectros de alta resolução espacial e espectral, permitindo a análise qualitativa e quantitativa de proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e carboidratos em amostras biológicas (Loutherback et al., 2015).

Contudo, a análise de amostras biológicas vivas apresenta desafios, pois as moléculas de água absorvem fortemente a radiação infravermelha, mascarando sinais de outras biomoléculas de interesse. Além disso, a manutenção das células vivas, hidratadas e funcionais durante a análise pode ser um obstáculo adicional (Loutherback et al., 2015). Dispositivos microfluídicos permitem a análise de células vivas por μ -FTIR. Esses dispositivos utilizam uma fina camada de água ($<10\ \mu\text{m}$), reduzindo a absorção da radiação infravermelha pela água (Loutherback et al., 2016). Assim, é possível proporcionar ambientes estáveis, com o fornecimento de meios nutritivos para manter as células viáveis e a obtenção de espectros de alta qualidade, já que pequenas quantidades de água podem ser toleradas.

Entretanto, o desenvolvimento desses sistemas enfrenta desafios, desde problemas de contaminação até a manutenção da viabilidade celular, que pode ser comprometida dependendo das características das células estudadas (Loutherback et al., 2016). Esses desafios são particularmente relevantes para os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que devem ser mantidos em associação com a planta hospedeira viva para serem estudados em sua total integridade.

A associação simbiótica entre plantas e FMAs possui grande relevância nas áreas de nutrição mineral e fisiologia vegetal, assim como para a conservação e restauração de ecossistemas e para o estudo de processos biogeoquímicos. É importante ressaltar o papel da simbiose micorrízico arbuscular (MA) na absorção de água e nutrientes, além do aumento da tolerância de plantas aos estresses bióticos e abióticos e o seu papel na formação e estabilidade de agregados do solo (van der Heijden e Horton, 2009; Bonfante e Genre, 2010; Gianinazzi et al., 2010). Dessa forma, a compreensão da biologia desses fungos utilizando técnicas analíticas diversificadas pode trazer importantes avanços científicos, sendo inclusive de grande potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

Estudos *in vivo* de hifas extrarradiculares de FMA em simbiose com seu parceiro fotossintetizante podem contribuir para o conhecimento básico sobre a composição, metabolismo, crescimento e fisiologia destes fungos particulares. Além disso, poderiam colaborar para o entendimento sobre os processos de absorção e translocação de nutrientes através de suas hifas cenocíticas. Pesquisas com ênfase na absorção de P, suas transformações químicas no interior do fungo e no transporte de moléculas de polyP sob uma perspectiva espaço-temporal seriam, por exemplo, uma aplicação para este tipo de sistema. Outros aspectos relacionados aos FMA que ocorrem no micélio extrarradicular, como eventos de anastomose ou mesmo de reprodução também poderiam ser elucidados a partir do uso desse tipo de sistema. Estudos *in vivo* de FMA associados à planta hospedeira, são essenciais para entender interações complexas, bem como respostas específicas aos estresses ambientais.

A recentemente proposta “câmara *AMSlide*”, por exemplo, é um dispositivo desenvolvido para análise microscópica de FMA que foi projetado com o intuito de captar imagens não invasivas durante a simbiose em tempo real (McGaley et al., 2024). A *AMSlide* é um tipo de câmara de crescimento transparente, que possibilita a visualização das raízes colonizadas (McGaley et al., 2024). Os pesquisadores utilizaram a técnica de microscopia de fluorescência para acompanhar a simbiose MA, o que permitiu a observação detalhada de estruturas do micélio intrarradicular no córtex radical. O trabalho ainda sugere que a metodologia possa ser adaptada para outras aplicações em pesquisas relacionadas à associações entre plantas e fungos (McGaley et al., 2024).

Diante dessas perspectivas, este experimento teve como objetivo desenvolver um dispositivo que permitisse o crescimento do FMA *in vivo* para sua análise por μ -FTIR. Para isso, foram desenvolvidos protótipos de sistemas de crescimento *in vivo*, nos quais o micélio extrarradicular do FMA, fisicamente isolado da raiz hospedeira, pudesse crescer

sobre substratos de ouro (Au), utilizados como suporte de amostras em análises de μ -FTIR no modo reflectância.

Neste estudo, a viabilidade do dispositivo foi avaliada com base na sobrevivência da planta micorrizada nos sistemas protótipos e na presença de hifas extrarradiculares nos substratos de μ -FTIR. Além disso, foi proposta a análise por μ -FTIR das hifas extrarradiculares de FMA que se desenvolvessem nos sistemas.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Material biológico e condições de crescimento das plantas hospedeiras

Para a montagem dos sistemas foram utilizadas as espécies de planta, *Urochloa decumbens* e *Allium porrum* L., consideradas boas hospedeiras para FMA (Hepper et al., 1998; Douds et al., 2008). Os FMA utilizados foram dois isolados diferentes de *Rhizophagus intraradices*, um deles foi o inóculo comercial Rootella BR® (NovaTero, Joinville – Santa Catarina, Brasil) e o outro, um isolado da coleção de FMA da Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Campinas, São Paulo). Sementes de *U. decumbens* foram desinfetadas superficialmente com solução de NaClO 2,5% por 10 min e distribuídas em tubetes plásticos de 100 ml, previamente desinfetados, contendo areia esterilizada em autoclave (2 ciclos de 1 h a 120 °C, 1 atm).

A inoculação do FMA ocorreu na ocasião da semeadura, utilizando 0,1 g de inóculo de Rootella por tubete. As plantas foram cultivadas em condições de casa de vegetação por períodos entre 30 e 60 dias. Elas foram irrigadas duas vezes por semana com o total de 15 mL de solução nutritiva de Hoagland a ½ força e com concentração de P reduzida (100 mM), para estimular a micorrização. A solução nutritiva foi preparada com água esterilizada. Algumas raízes foram coletadas dos tubetes ao longo do desenvolvimento das plântulas para avaliar a extensão da colonização micorrízica antes da transferência para os sistemas. Para a produção de plantas micorrizadas para sistemas posteriores, foram utilizados os mesmos procedimentos, no entanto, alguns cultivos foram realizados em condições de câmara de crescimento e/ou com a utilização de sacos do tipo *sunbag* (Sigma), para evitar contaminação.

2.2.2 Montagem dos sistemas

Para montagem do primeiro sistema, uma planta de *U. decumbens* colonizada por *R. irregularis* com aproximadamente 30 dias de cultivo em tubete foi selecionada e

retirada integralmente do substrato, preservando ao máximo raiz e parte aérea. As folhas senescentes foram cuidadosamente removidas e as raízes lavadas em água estéril. Os materiais resistentes ao calor utilizados durante o procedimento, como pinças, espátulas, pontas de micropipetas, papel-filtro, vidros e vermiculita, foram esterilizados em autoclave (121°C, 1 h). Já os materiais não resistentes ao calor, como a malha de nylon e a microplaca de 96 poços contendo os substratos de Au, foram desinfetados com etanol 70% por 15 min, seguido de exposição à luz ultravioleta, por 1 h em fluxo laminar, imediatamente antes da montagem do sistema.

As raízes da planta foram colocadas dentro de uma malha de nylon, com 0,25 mm de abertura dos furos, que foi envolta por papel-filtro e em seguida, posicionada sobre uma microplaca de 96 poços previamente adaptada para o experimento, contendo o substrato porta-amostras de Au (5 x 5 mm) e recortes de papel-filtro, de mesma dimensão, sobre três lâminas de microscopia (Fig. 2.2 a-e). Os recortes de papel-filtro foram utilizados com a função de reter umidade, sendo uma fonte de hidratação para o micélio fúngico. A microplaca de 96 poços teve dois lados da tampa furada, um para permitir uma abertura de 1 cm de diâmetro, para posicionar a parte aérea da planta, e outra abertura inferior, de mesmo tamanho, para permitir a saída do possível excesso de água. Foi adicionada vermiculita estéril nos poços das duas primeiras colunas da microplaca, que foi umedecida com 200 µL de água deionizada estéril por poço (Fig. 2.2 d-e). O objetivo da vermiculita foi manter o ambiente úmido para o desenvolvimento das raízes.

A tampa da microplaca foi cuidadosamente colocada e fechada com parafilme. Apenas a abertura para a parte aérea se manteve descoberta (Fig. 2.2 f-h). Através da abertura, a planta foi irrigada com 1 mL de solução nutritiva de Hoagland a ½ força e sem P. A microplaca do sistema foi coberta com papel alumínio, para manter as raízes no escuro, e deixada em câmara de crescimento, a 25° C, umidade relativa de 50% e fotoperíodo de 12 h, por 10 dias (Fig. 2.2 g-h).

Ao todo foram feitos oito sistemas utilizando microplacas de 96 poços, sendo que a cada sistema construído buscou-se otimizar a metodologia com pequenos ajustes. Ao final do período de 10 dias, tempo estimado suficiente para o crescimento das hifas extrarradiculares sobre o substrato de Au, as microplacas eram abertas e avaliadas. Um microscópio estereomicroscópio foi utilizado para a análise do crescimento de hifas, que foi registrado por microfotografias. As raízes foram retiradas e acondicionadas em etanol 50% para posterior avaliação da colonização intrarradicular. Para um dos sistemas, foram utilizados também substratos de fluoreto de bário (BaF₂) e de Au tratados com fosfato de feridrita (P-feridrita), gentilmente fornecidos por colaboradores do LNLS.

2.2.3 Avaliação da colonização micorrízica intrarradicular

Amostras de raízes coletadas antes e após a elaboração de cada protótipo foram armazenadas em etanol 50%. Para clareamento das raízes, estas foram mantidas em KOH 2,5% por 24 h a temperatura ambiente. Após este período, foram lavadas novamente, coloridas com solução de tinta de tintureiro a 5% em vinagre por 1 h e 20 min (Vierheilig et al., 1998) e armazenadas em glicerol acidificado. Para estimar a porcentagem de raiz colonizada por FMA, 30 fragmentos de raiz de 1 cm foram dispostos sobre lâminas de microscopia e observados em microscópio óptico (Leica DFC295) no aumento de 40× a 200×. Para determinar a frequência micorrízica (F) e intensidade (M), foi avaliada a presença de estruturas como hifas, arbúsculos e vesículas de FMA seguindo o método proposto por Trouvelot et al. (1986).

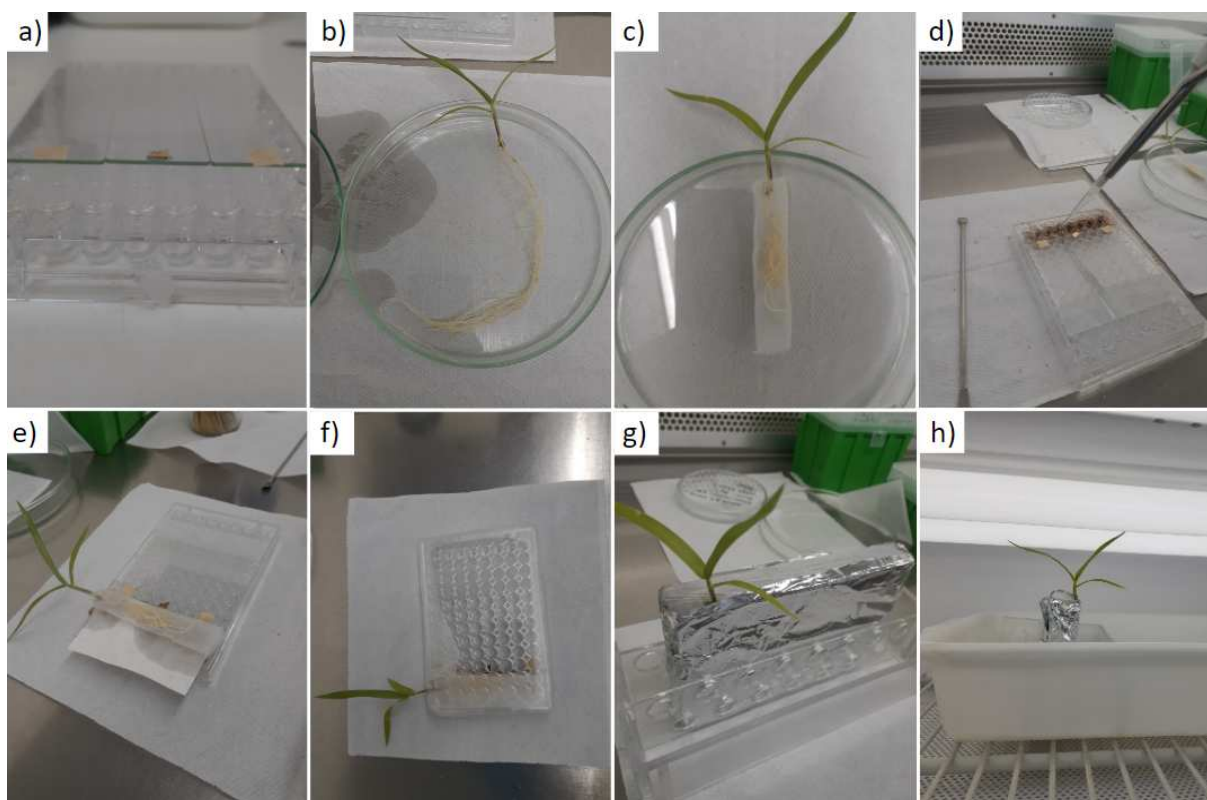


Figura 2.2 Sequência de montagem de sistema planta-FMA. Microplaca de elisa de 96 poços com substratos de ouro (Au) e papel-filtro sobre lâminas de microscopia (a), planta micorrizada selecionada para uso no sistema (b), raízes dentro da malha de nylon (abertura de 0,25 mm) (c), duas fileiras de poços da microplaca preenchidas com vermiculita umedecida (d), posicionamento da planta no sistema (e), placa selada com parafilme (f), coberta por papel alumínio (g) e deixada por 10 dias em câmara de crescimento (h).

2.2.4 Análise de hifas por μ -FTIR

As hifas que se desenvolveram sobre os substratos de Au, após a abertura e avaliação dos sistemas, foram analisadas por μ -FTIR. Os substratos foram mantidos em caixa dessecadora por pelo menos 24 h. A seleção das hifas foi realizada utilizando o espectromicroscópio de FTIR (Cary 620, Agilent Technologies), considerando características morfológicas típicas de FMAs, como ausência de septos, coloração clara e diâmetro acima de 10 μ m. Entretanto, nas microplacas onde ocorreu crescimento de hifas nos substratos, não foram identificadas estruturas com características típicas de FMA. Dessa forma, foram realizadas análises no modo de reflectância de algumas das hifas extrarradiculares de fungos não micorrízicos arbusculares (não-MA) observadas. Paralelamente, hifas extrarradiculares de FMA foram extraídas de vasos de multiplicação contendo plantas de *U. decumbens* colonizadas por *R. intraradices*. Fragmentos dessas hifas foram depositados sobre substratos de Au e de BaF₂ para análises por μ -FTIR nos modos reflectância e transmitância, respectivamente.

As medições foram realizadas com um detector do tipo FPA, resolução espectral de 8 cm⁻¹, 256 varreduras e no modo “*high magnification*”. Ao menos três fragmentos distintos de hifas foram avaliados para cada amostra analisada. Como referência, foi utilizada uma fração da superfície limpa do substrato porta-amostra. As imagens hiperespectrais foram processadas utilizando o software “Orange: Data Mining Toolbox in Python” (University of Ljubljana, Slovenia). Os espectros gerados foram corrigidos por ajuste de linha de base (*Rubber Band*) e suavizados com a função “*Gaussian Smoothing*”. O espectro médio das hifas foi obtido a partir da média de pelo menos três espectros distintos para cada tipo de amostra.

2.3 Resultados

2.3.1 Viabilidade e eficiência dos protótipos

Seis dos oito sistemas desenvolvidos foram eficientes quanto à viabilidade de sustentar o crescimento da planta hospedeira, que permaneceu viva e túrgida durante os 10 dias de experimento. Nesses seis sistemas, também foi confirmada a presença de colonização por FMA no córtex radicular das plantas utilizadas após os 10 dias de experimento na microplaca. Contudo, não foi observada a presença de hifas extrarradiculares de FMA sobre os substratos de Au ou sobre o papel-filtro contíguo ao compartimento das raízes. Não foi confirmada a presença de estruturas do micélio extrarradicular de FMA em outras superfícies e espaços internos das microplacas.

Contudo, também foi observada a presença de hifas septadas de fungos não-MA em todos os sistemas desenvolvidos no qual as plantas hospedeiras se mantiveram viáveis até a abertura das microplacas. Houve colonização por fungos não-MA no córtex radicular das plantas, bem como nos substratos de Au e no papel-filtro. As hifas desses fungos se originaram do compartimento das raízes, uma vez que ao seguir seu trajeto de crescimento foi possível constatar que essas cruzavam a malha de nylon através compartimento radicular, no sentido das raízes para o exterior. Também foi possível observar o mesmo tipo de hifas na superfície das raízes. A malha de nylon cumpriu o papel proposto de restringir as raízes apenas em um compartimento da microplaca, separando-as das hifas.

Tabela 2.1 Otimizações realizadas entre os protótipos testados. Um total de oito sistemas foi elaborado, mas em nenhum foi possível visualizar FMA sobre os substratos de Au.

(continua)

Sistema	Planta hospedeira	Inóculo FMA	Mudança em relação ao sistema anterior	Principais observações
1	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> Rootella BR	1ª tentativa	Baixa colonização FMA; Contaminação por fungos não-MA em raízes e superfícies internas da placa
2	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> Rootella BR	Retirada do papel-filtro; Posicionamento central da planta; Adição de substratos de Au	Baixa colonização FMA; Contaminação por fungos não-MA em raízes e superfícies internas da placa
3	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> Rootella BR	Uso de substratos de Au e de BaF ₂ tratados com P-ferridrita	Baixa colonização FMA; Contaminação por fungos não-MA nas raízes e superfícies internas da placa
4	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> IAC	Novos inóculos; Plântulas mais jovens (<60 dias)	Plantas não sobreviveram
5	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> IAC	Novos inóculos; Plântulas mais jovens (<60 dias)	Plantas não sobreviveram

6	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> IAC	Plantas >60 dias; Alta colonização FMA	Alta colonização FMA; Fungos não-MA não visível nas raízes; Contaminação por fungos não-MA na placa
7	<i>Allium porrum</i>	<i>R. intraradices</i> Rootella BR	Inóculo Rootella; Troca da planta	Alta colonização FMA; Fungos não-MA não visível nas raízes; Contaminação por fungos não-MA na placa
8	<i>U. decumbens</i>	<i>R. intraradices</i> IAC	Reforço das práticas anti-contaminação; Alta colonização FMA	Alta colonização FMA; Fungos não-MA não visíveis nas raízes; Contaminação por fungos não-MA na placa

A cada confecção de novo sistema foram feitas pequenas adaptações em relação ao sistema anterior, buscando a sua otimização e levando em consideração principalmente o problema de contaminação por fungos não-MA (Tabela 2.1). A partir do segundo sistema, possíveis fontes de carbono para fungos não-MA com capacidade saprofítica, como o papel-filtro, foram retiradas da montagem das microplacas. O compartimento radicular, contendo a planta, também foi posicionado na porção central, o que permitiu aumentar a quantidade de substratos de Au para seis em vez de um. Para o terceiro protótipo, substratos de Au tratados com P-ferridrita e substratos de BaF₂ foram utilizados. Os substratos de Au tratados com P-ferridrita tinham a função de condicionar alguma forma de tropismo das hifas de FMA para uma possível fonte de P. Já o substrato de BaF₂, que é considerado potencialmente tóxico para células vivas e utilizado no modo de transmissão durante as medidas por μ -FTIR, foi testado para avaliar a possibilidade do crescimento de hifas sobre este. No entanto, no caso dos substratos de Au tratados com P-ferridrita houve apenas presença de hifas de fungos não-MA. Quanto ao substrato de BaF₂, não houve o crescimento de qualquer tipo de hifa sobre o material.

2.3.2 Colonização micorrízica das raízes

A colonização intrarradicular das plantas antes da montagem dos sistemas e após a sua abertura foi constatada pela observação da presença de estruturas típicas de FMA, tais como hifas intrarradiculares asseptadas, arbúsculos e vesículas (Fig. 2.3 a-d). Entretanto, também foi comum observar a presença de fungos conhecidos como *dark septate endophyte* (DSE), que são um grupo parafilético de fungos endofíticos pertencentes ao filo Ascomycota, caracterizados por suas hifas septadas e melanizadas, com coloração que varia entre avermelhado escuro, marrom e preto, além da produção de microescleródios e conídios (Fig. 2.4 a-d).

Tabela 2.2 Colonização intrarradicular por FMA das plantas utilizadas nos sistemas. Frequência de micorrização do sistema radicular, F (%) antes da montagem do sistema e depois de sua abertura aos 10 dias.

Protótipo	F (%) antes	F (%) depois
1	23,3	16,7
2	13,3	36,7
3	13,3	23,3
4	86,7	-
5	63,3	-
6	96,7	100,0
7	90,0	93,3
8	94,3	98,7

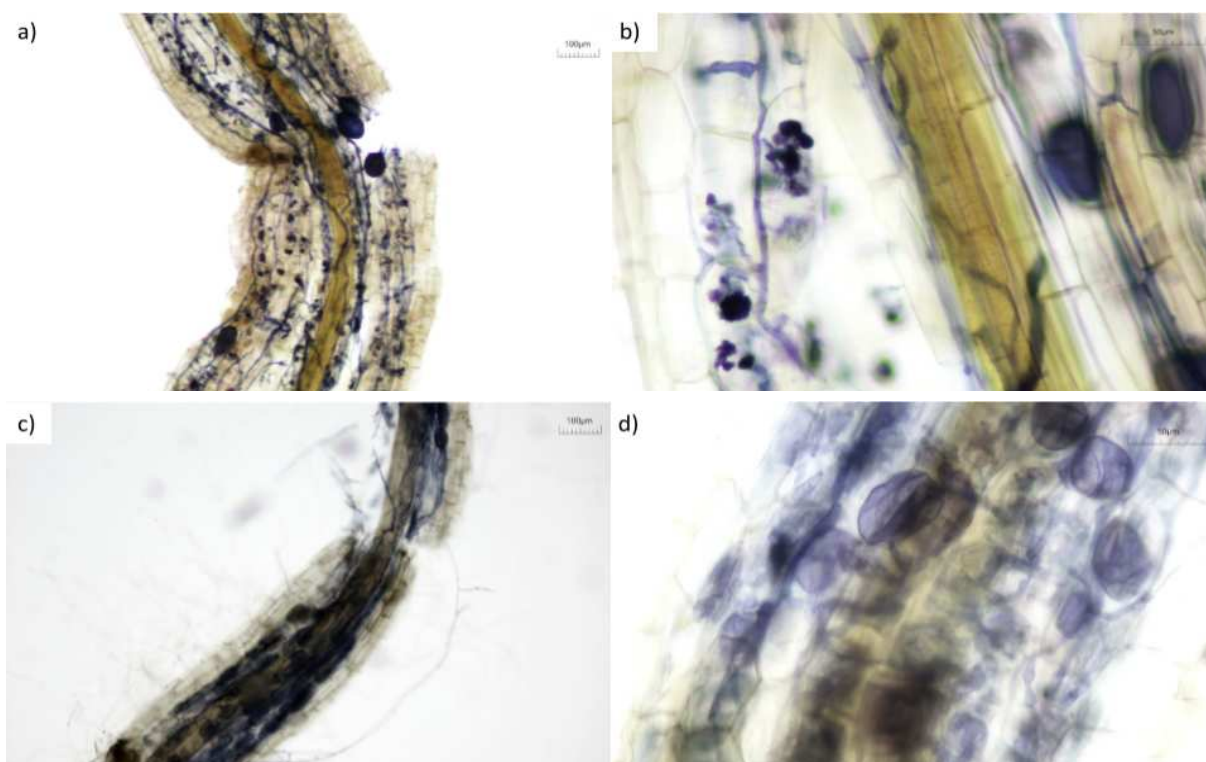


Figura 2.3 Raízes de *Urochloa decumbens* colonizadas por *Rhizophagus intraradices*. Fragmentos de raízes colonizados por hifas intercelulares asseptadas (a-d), arbúsculos (b, d) e vesículas (a-d).

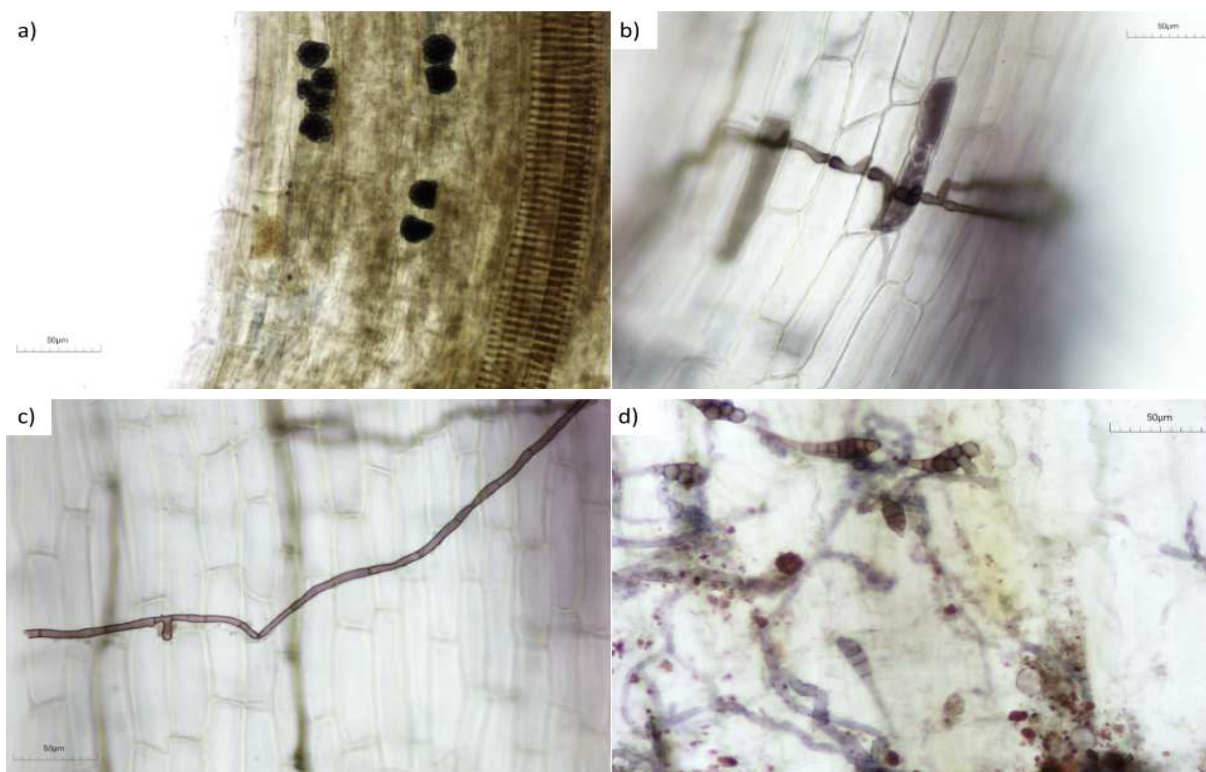


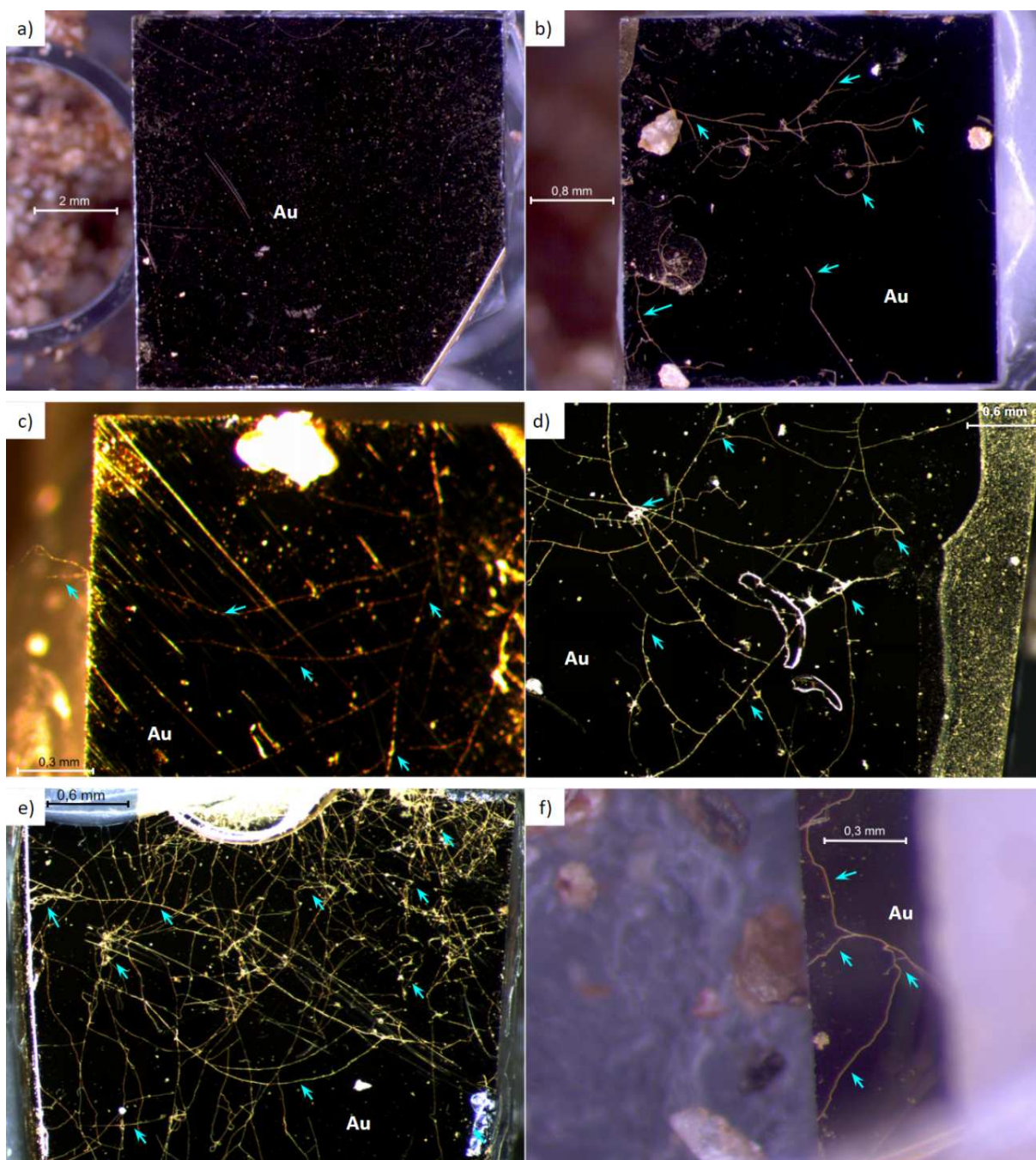
Figura 2.4 Raízes de *Urochloa decumbens* colonizadas por fungos *dark septate endophyte* (DSE). Microescleródios (a-b), hifas septadas melanizadas (c) e conídios (d).

Como a porcentagem de colonização das raízes nos três primeiros sistemas foi relativamente baixa, o tipo de inóculo de FMA foi trocado para um isolado de *R. intraradices* proveniente da coleção do IAC, em Campinas, São Paulo. Esse novo isolado melhorou significativamente a frequência de colonização, que aumentou em média cinco vezes em relação ao inóculo anterior (Tabela 2.2). Não foi possível analisar a taxa de colonização no quarto e quinto sistema devido à morte das plantas hospedeiras.

2.3.3 Crescimento de hifas sobre substratos de μ -FTIR e outras superfícies internas das microplacas

Desde a abertura do primeiro sistema, hifas fúngicas foram observadas nas superfícies da microplaca e sobre os substratos de Au (Fig. 2.5 b-l). Foi possível notar sobre algumas raízes, em sua na superfície externa, hifas de cor clara e morfologia compatível com FMA (Fig. 2.5 j-k). Entretanto, também foram observadas algumas hifas de cor escura, compatíveis com fungos não-MA (Fig. 2.5 l). Hifas septadas e de coloração escura foram encontradas sobre o papel-filtro do primeiro sistema, de forma que mesmo a olho nu foi

identificada a presença de pontos escuros, típicos de superfícies contaminadas por espécies de fungos septados. Na superfície da microplaca foram observadas hifas com morfologia característica de fungos não-MA, como diâmetro de entre 5 e 10 μm , ramificações formando ângulos retos (90°) e espalhamento profuso pelo espaço, incluindo crescimento sobre as lâminas de vidro e nas estruturas plásticas internas da microplaca, bem como sobre tampa e cruzando os espaços dos poços.



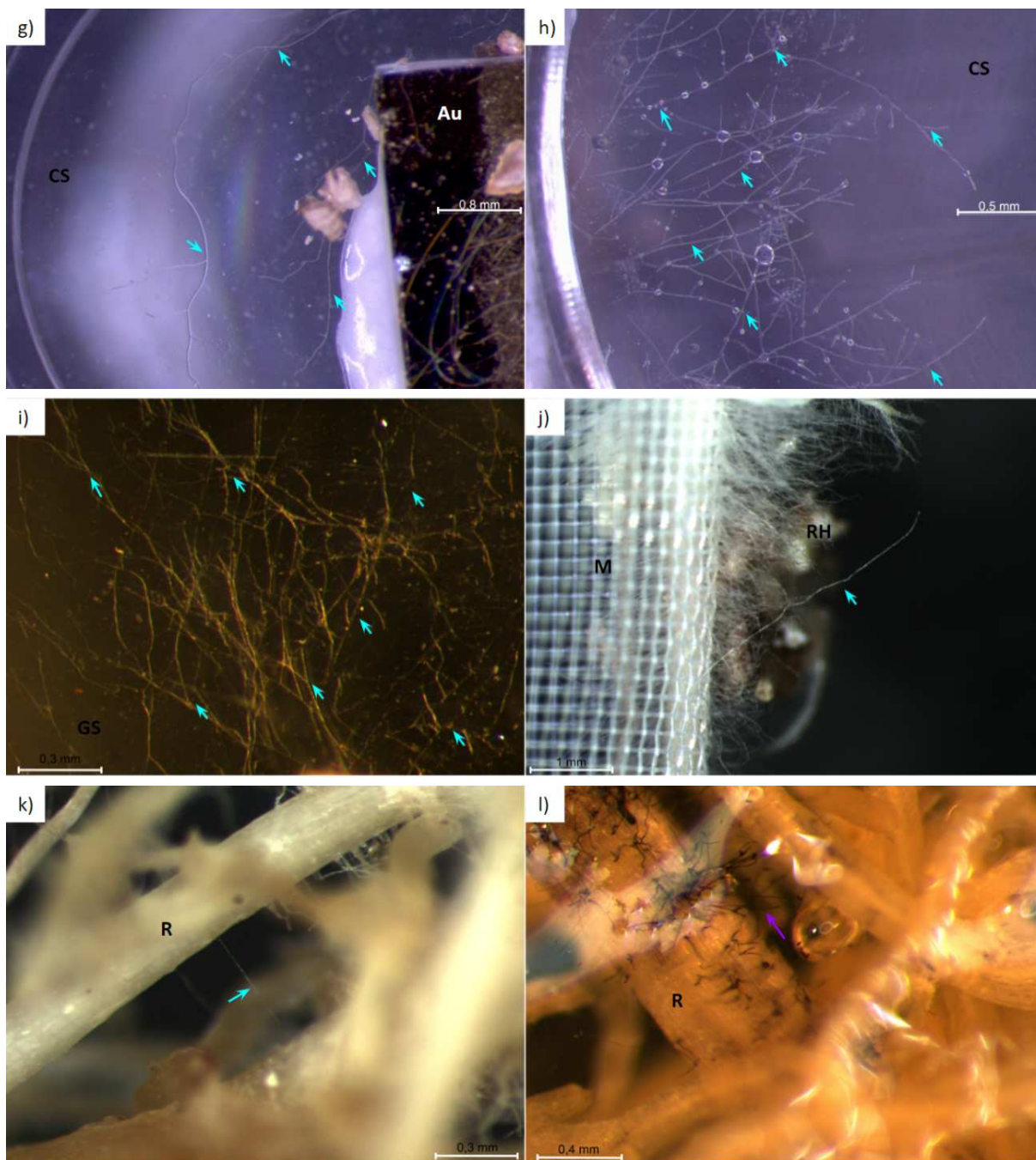


Figura 2.5 Imagens dos espaços internos dos sistemas após abertura das microplacas. Superfície do substrato de ouro (Au) em sem (a) e com (b) crescimento de hifas (setas azuis) sobre sua superfície. Hifas sobre substrato de Au com morfologia típica de fungos não-MA, apresentando diâmetro de baixa espessura (5-10 μm), crescimento profuso e ramificações com ângulo reto ou em formato de “espinha de peixe” formando micélio rizomórfico (b-f). Presença de hifas na superfície da microplaca (CS) (g-h) e sobre o vidro das lâminas de microscopia (GS) no interior dos sistemas (i). Hifa de morfologia saindo pela malha de nylon (M) e pelos radiculares (RH) (j). Raízes (R) com a presença externa de hifas similares a FMA (k) e de hifas características de fungos não-MA (l). Microfotografias captadas por estereomicroscópio.

2.3.4 Análise composicional de hifas por μ -FTIR

Foram analisadas por μ -FTIR e comparadas quanto ao perfil composicional as hifas que se desenvolveram sobre os substratos de Au do primeiro e do sexto sistemas, além das hifas extrarradiculares de FMA previamente extraídas de um inóculo de *R. intraradices*. Embora a presença de FMA tenha sido confirmada no córtex radicular das plantas utilizadas nos sistemas, as hifas extrarradiculares observadas na microplaca foram identificadas morfológicamente como fungos não-MA. Diferentemente dos FMA, esses fungos apresentaram septos, coloração marrom-avermelhada e espessuras das hifas variando entre 5 a 10 μm , conforme análise por estereomicroscópio e microscopia de luz.

Dessa forma, a técnica de μ -FTIR foi utilizada para evidenciar as diferenças espectrais entre os dois tipos de fungos com base na análise de suas hifas extrarradiculares. Para essa comparação, foram obtidos os espectros médios de cada tipo de hifa analisada (Fig. 2.6 a-b). A identificação dos principais picos nos espectros médios foi baseada nos modos vibracionais predominantes em cada faixa de número de onda e nos compostos moleculares de interesse biológico (Tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente).

Os espectros obtidos para as hifas extrarradiculares de cada tipo de fungo foram plotados no mesmo gráfico (Fig. 2.7 a-d). Duas regiões espectrais foram destacadas: entre 3000 e 2800 cm^{-1} e entre 1800 e 1000 cm^{-1} . Nessas regiões, foram identificados os picos de interesse biológico com seus respectivos valores de números de onda (Fig. 2.7 b-d).

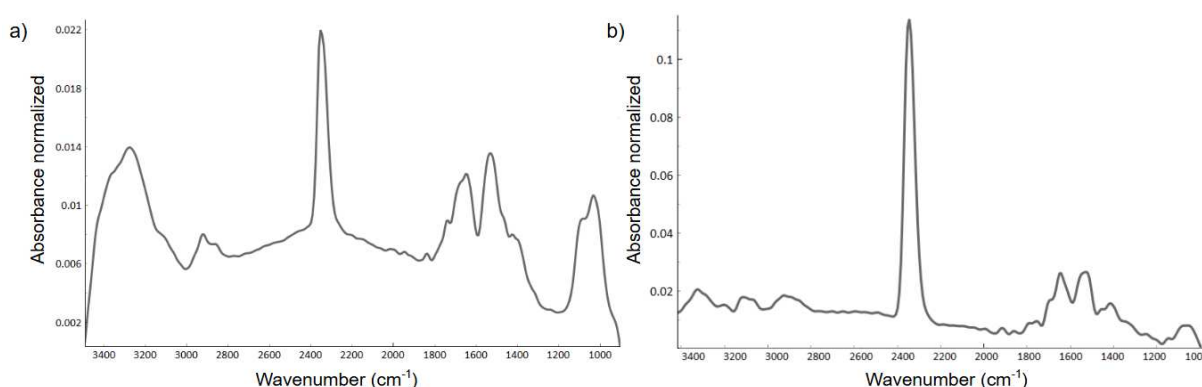


Figura 2.6 Espectros μ -FTIR médios das hifas extrarradiculares. Espectros médios de *Rhizophagus intraradices* (a), extraído de um vaso de multiplicação, e fungo não-MA (b), contaminante presente nas microplacas dos sistemas protótipos.

As regiões acima de 3050 cm^{-1} estão associadas a vibrações das ligações C-H, N-H e O-H contudo, devido à alta amplitude e intensidade dos picos de O-H, atribuídos à presença natural de água nas amostras, as informações dessa região não foram consideradas na análise (Movasaghi et al., 2008). A faixa espectral entre 2800–1800 cm^{-1}

também não contém informações relevantes para o escopo deste trabalho, pois está associada às vibrações de CO₂ e do grupo O-H da molécula de H₂O, que atuam como contaminantes nessa região devido à sua alta concentração no ar atmosférico (Movasaghi et al., 2008; Jury e Starzyk, 2017).

Tabela 2.3 Principais picos observados para hifas extrarradiculares do FMA *Rhizophagus intraradices*. Modos vibracionais: ν , alongamento, ν_s , alongamento simétrico, ν_{as} , alongamento assimétrico, δ , flexão e, ω , oscilação.

Principais picos das hifas FMA	Número de onda (cm ⁻¹)	Modos vibracionais	Compostos relacionados
1010–1050	1020–1050	ν C-O-C, ν C-O, δ C-O, δ C-OH	Carboidratos, como glicose e glicogênio
1080–1105	1095–1105	ν_{as} C-O-C, ν_s PO ₄ ²⁻ , ν_s P-O-C	Polissacarídeos, como quitina e compostos fosfatados, como ácidos nucleicos
1220–1250	1210–1280	ν_{as} PO ₄ ²⁻ , ν_s PO ₄ ³⁻	Compostos fosfatados, como polyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana
1310	1310-1315	Deformação de CH ₂ , δ -OH	Amida III (proteínas)
1370–1390	1370–1380	δ CH ₂ , ν C-C, ν C-O e deformação de C-H e N-H	Polissacarídeos, como quitina fúngica
1430–1460	1410–1445	Deformação de C-H, N-H, ν C-N, ν_s COO ⁻ , δ CH ₂	Lipídios e polissacarídeos, incluindo anel de piranose (relacionado à glucanos)
1520–1540	1600–1500	δ N-H e ν C-N	Amida II (proteínas)
1650	1600–1700	ν C=O, δ C-N, δ N-H	Amida I (proteínas, especialmente transmembrana)
1740	1740–1745	ν C=O	Lipídios
2850–2920	2800–3000	ν_{as} CH ₂ e ν_{as} CH ₃	Lipídios

Tabela 2.4 Principais picos observados para as hifas extrarradiculares de fungos não-MA. Modos vibracionais: ν , alongamento, ν_s , alongamento simétrico, ν_{as} , alongamento assimétrico, δ , flexão e, ω , oscilação.

Principais picos das hifas não-MA	Número de onda (cm^{-1})	Modos vibracionais	Compostos relacionados
1050–1080	1055–1090	$\nu\text{C-O}$, $\nu_{as}\text{C-O-C}$, $\nu_s\text{PO}_4^{2-}$	Desoxirribose, ribose, manose, ligação fosfodiéster, quitina
1145–1150	1145–1150	$\nu\text{C-O}$ e vibração do grupo PO_4^{3-}	Oligossacarídeos e compostos fosfatados, como polyP
1200–1270	1210–1280	$\nu_{as}\text{P=O}$, $\nu_{as}\text{PO}_4^{2-}$, $\nu_s\text{PO}_4^{3-}$	Compostos fosfatados, como polyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana
1330–1360	1330–1360	ωCH_2 , $\nu\text{C-O}$, deformação de C-H e N-H,	Polissacarídeos, proteínas, melanina
1410–1420	1400–1420	νCOO^- , deformação de C-H e N-H, $\nu\text{C-N}$	Aminoácidos, proteínas e lipídios
1455–1460	1456	δCH_3	Lipídios e proteínas
1520–1550	1500–1600	$\delta\text{N-H}$ e $\nu\text{C-N}$	Amida II (proteínas)
1640–1650	1600–1700	$\nu\text{C=O}$, $\delta\text{C-N}$ e $\delta\text{N-H}$	Amida I (proteínas, principalmente transmembrana)
1700	1700–1720	$\nu\text{C=O}$	Ácidos nucleicos e bases nitrogenadas
1735–1770	1740–1745	$\nu\text{C=O}$	Lipídios
2880–2950	2800–3000	$\nu_{as}\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_3$	Lipídios

Os espectros das hifas de ambos os tipos de fungos apresentaram formação de picos na faixa de 3000 a 2900 cm^{-1} , sendo essa região caracterizada pela presença dos grupos CH_2 e CH_3 de cadeias de hidrocarbonetos comumente presentes em lipídios (Fig. 2.7 b-d) (Movasaghi et al., 2008). Em ambos os espectros das diferentes espécies, também houve a formação de picos evidentes nas regiões entre 1700 e 1500 cm^{-1} , que são caracterizadas como as regiões da amida I (1700–1600 cm^{-1}) e amida II (1600–1500 cm^{-1})

(Fig. 2.7 b-d). Essas faixas de número de onda sinalizam vibrações nas ligações C-N, N-H e C=O, indicando principalmente a estrutura secundária de proteínas (Movasaghi et al., 2008).

A região entre os números de onda 1200 e 1000 cm^{-1} está relacionada à presença de açúcares e carboidratos, contudo nesta região também existem vibrações associadas à compostos fosfatados como ácidos nucleicos, fosfolipídios e proteínas fosforiladas (Movasaghi et al., 2008). Nessa faixa de número de onda foi possível notar no espectro referente ao FMA, a formação de um pico de elevada intensidade de absorbância (Fig. 2.7 b-d). Além disso, é interessante ressaltar a posição de seus dois picos finais, nas bandas de 1105–1080 cm^{-1} e 1050–1010 cm^{-1} , que indicam a presença de oligossacarídeos e compostos fosfatados, bem como glicose, glicogênio, glucanos e quitina (Fig. 2.7 b-d) (Movasaghi et al., 2008; Skotti et al., 2014; Singla et al., 2021; Shapaval et al., 2023).

Já o espectro referente à amostra de fungo não-MA, apresentou dois picos na faixa dos carboidratos ligeiramente deslocados para a esquerda em relação aos picos do espectro do FMA, nas regiões de 1080 a 1050 cm^{-1} e 1150 a 1145 cm^{-1} , que podem indicar a presença de ribose e desoxirribose, manose, quitina, oligossacarídeos e compostos fosfatados (Fig. 2.7 b-d) (Movasaghi et al., 2008; Singla et al., 2021).

O espectro da hifa não-MA exibiu picos nas bandas 1755 e 1700 cm^{-1} , que também podem evidenciar a presença de lipídios, bem como a de ácidos nucleicos (Fig. 2.7 b-d) (Movasaghi et al., 2008; Shapaval et al., 2023). A formação de picos entre a banda de 1500–1300 cm^{-1} sugere a presença de uma variedade de compostos, que podem incluir lipídios, proteínas e carboidratos (Fig. 2.7 b-d). Também no espectro referente às hifas do fungo não-MA, foi observado um pico em 1455 cm^{-1} , possivelmente associado à vibração de grupos CH_3 em lipídios e proteínas e um pico mais acentuado entre 1420 e 1410 cm^{-1} , faixa caracterizada por vibrações dos grupos COO^- , C-H, N-H, C-N, que semelhantemente estão presentes em lipídios e proteínas (Fig. 2.7 b-d).

O espectro referente às hifas extrarradiculares de FMA, por sua vez, apresentou um pico entre 1460 e 1430 cm^{-1} (Fig. 2.7 b-d). Nessa faixa de número de onda, é possível identificar vibrações dos grupos C-H, N-H, C-N, COO^- , CH_2 , relacionados tanto à lipídios, quanto à polissacarídeos. Além disso, essas bandas incluem estruturas de anéis de piranose, que são formas cíclicas de carboidratos compostas por seis átomos, cinco carbonos e um oxigênio, e são comumente encontradas em aldoses, como a glicose, e cetoses, como a frutose (Poletto et al., 2013; Li et al., 2023).

Foi possível observar a formação de um pico entre 1360 e 1330 cm^{-1} no espectro referente à hifa não-MA e um pico entre 1390 e 1370 cm^{-1} no espectro do FMA (Fig. 2.7 b-d). Essas faixas de número de onda estão associadas a diferentes tipos de vibrações entre os átomos dos grupos CH_2 , C-O, C-H, N-H e C-C. Apesar de próximas,

essas bandas contêm informações distintas. No caso da hifa não-MA é possível destacar a presença de polissacarídeos, proteínas e do pigmento melanina (Singla et al., 2021).

Já para o FMA, também se destaca a presença de polissacarídeos, porém com ênfase na estrutura da quitina (Movasaghi et al., 2008; Shapaval et al., 2023). A formação de um ombro no espectro do FMA, na posição de 1310 cm^{-1} , pode estar relacionada à banda de amida III, que marca a presença de proteínas pela vibração dos grupos CH_2 e $-\text{OH}$ (Fig. 2.7 d) (Movasaghi et al., 2008).

A faixa entre os números de onda entre 1280 e 1210 cm^{-1} é conhecida como banda de fosfato devido às vibrações entre as ligações dos grupos $\text{P}=\text{O}$, PO^{2-} e PO_4^{3-} , na qual é possível atribuir compostos como o polyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana (Movasaghi et al., 2008). Ambos os espectros dos distintos tipos de fungos apresentaram picos nesta região, entretanto no caso da hifa não-MA, um pico com elevada intensidade de absorbância cobriu a faixa de número de onda entre 1270 e 1200 cm^{-1} (Fig. 2.7 c). Por outro lado, no espectro da hifa de FMA foi possível observar a discreta formação de um pico entre 1250 e 1220 cm^{-1} , que pode conter informações referentes, principalmente, à vibrações dos grupos PO^{2-} e PO_4^{3-} (Fig. 2.7 d).

Mapas hiperespectrais gerados por FPA-FTIR foram utilizados para a localização dos compostos presentes nas hifas extrarradiculares de cada tipo de fungo. As regiões selecionadas foram: região de lipídios em 3000 a 2800 cm^{-1} , região das proteínas em 1700 a 1500 cm^{-1} , região do polifosfato (polyP) em 1280 a 1210 cm^{-1} e região dos carboidratos em 1200 a 1000 cm^{-1} (Fig. 2.8). A escolha dessas faixas de número de onda foi realizada de acordo com as principais bandas de modos vibracionais detectadas para cada composto, de forma que se evitou ao máximo a sobreposição entre esses compostos nas faixas selecionadas.

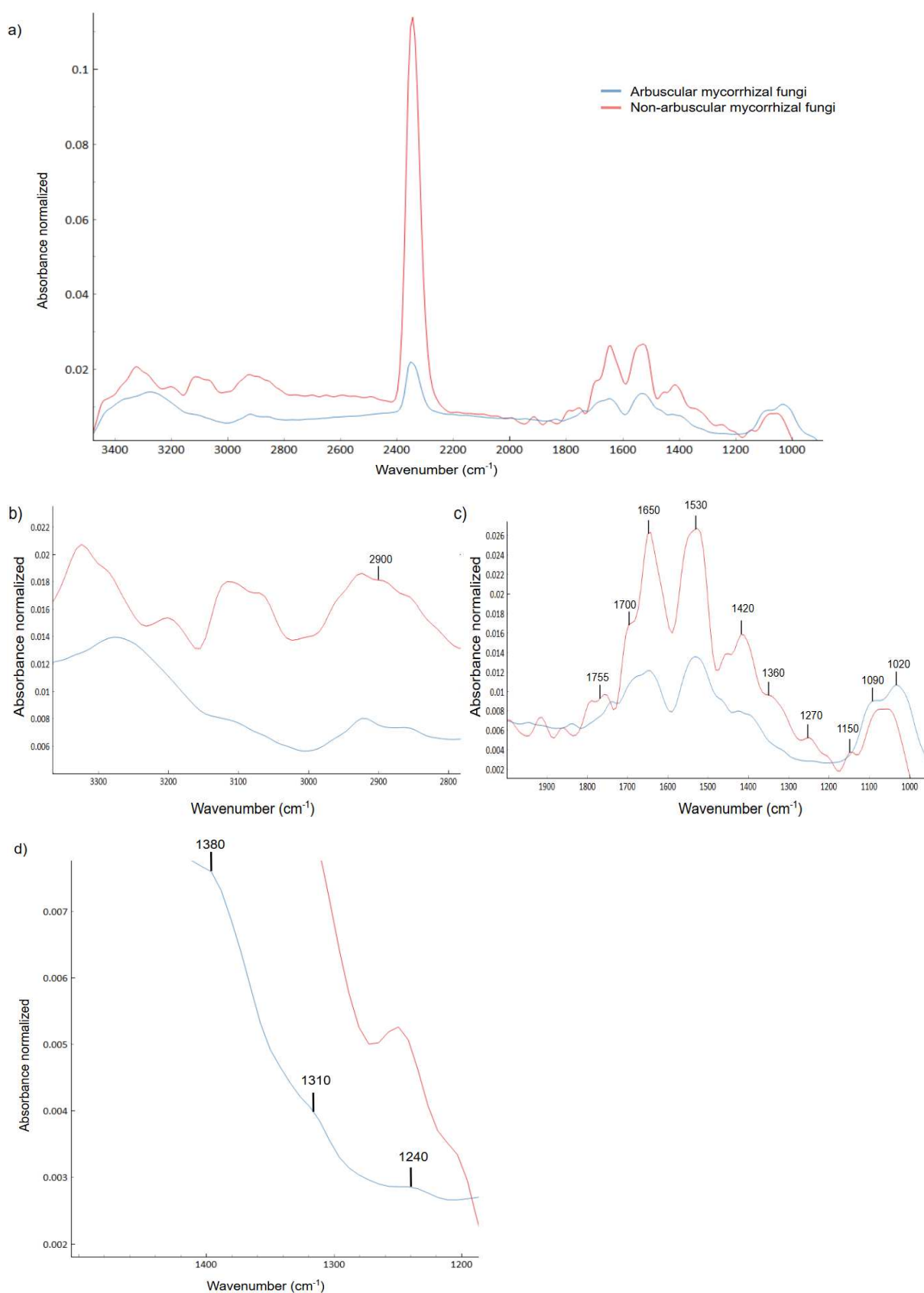


Figura 2.7 Espectros médios de hifas extrarradiculares do FMA e do fungo não-MA. A cor azul foi usada para o espectro médio das hifas extrarradiculares do FMA, a cor vermelha para o espectro médio de hifas extrarradiculares do fungo não-MA. Sendo, a, espectros completos, b, ênfase nas

regiões do espectro acima de 2800 cm^{-1} , c, entre 1800 e 1000 cm^{-1} e, d, regiões entre 1300 e 1200 cm^{-1} , evidenciando picos no espectro do FMA.

De acordo com os mapas hiperespectrais, a hifa de FMA apresentou lipídios da faixa selecionada por toda sua extensão, contudo foi possível perceber distribuição heterogênea de intensidade ao longo do comprimento da hifa analisada (Fig. 2.8). Regiões de menor intensidade se organizaram em formato alongado e afilado, próximo às bordas laterais da hifa. Na hifa não-MA, a distribuição de lipídios se diferenciou da hifa FMA, uma vez que foi possível notar uma divisão clara de sua localização ao longo da hifa (Fig. 2.8). Na imagem inferior da Fig. 2.8, duas hifas estão posicionadas lado a lado, sobrepondo-se apenas no limite superior do quadro.

A distribuição dos compostos na hifa não-MA seguiu a forma de sua morfologia septada. Enquanto as partes centrais de cada unidade septada apresentam maior intensidade de concentração de lipídios, no seu entorno houve menor presença deste composto. Entretanto, os lipídios se distribuíram ao longo da hifa não-MA de maneira mais homogênea do que as proteínas, por exemplo, que se concentram em áreas mais delimitadas posicionadas no centro de cada unidade da hifa septada (Fig. 2.8).

Para a hifa de FMA, a distribuição de proteínas pareceu estar posicionada de maneira mais homogênea em comparação à distribuição de lipídios. Apesar disso, foi possível notar a formação de regiões com maiores intensidades de proteínas, como na região onde a hifa forma uma bifurcação, por exemplo (Fig. 2.8). O posicionamento de proteínas se mostrou antagônico ao de lipídios, sendo possível notar a presença de lipídios onde houve menor distribuição de proteínas e vice-versa (Fig. 2.8).

Na hifa de FMA a intensidade de bandas relacionadas ao polyP foi relativamente fraca comparado à hifa não-MA. Contudo sua distribuição, assim como a das proteínas, se mostrou mais homogênea e contínua do que na hifa não-MA, que seguiu o padrão dos septos. A localização do polyP nas hifas pareceu mais relacionada à das proteínas do que à dos lipídios em ambos os fungos. Mesmo que em menor intensidade, foi possível notar regiões com distribuição semelhante entre os compostos ao longo das hifas.

Para a hifa de FMA, essa região está localizada principalmente no limite inferior das imagens, já na hifa não-MA, seguiu a divisão dos septos. Os compostos da região de carboidratos se distribuíram de forma similar ao observado para proteínas e polyP. Contudo, no espectro da hifa de FMA houve maior homogeneidade na distribuição dos carboidratos, que ocuparam todo o comprimento da hifa, possuindo variações sutis de intensidade se comparada à distribuição das proteínas na mesma hifa (Fig. 2.8).

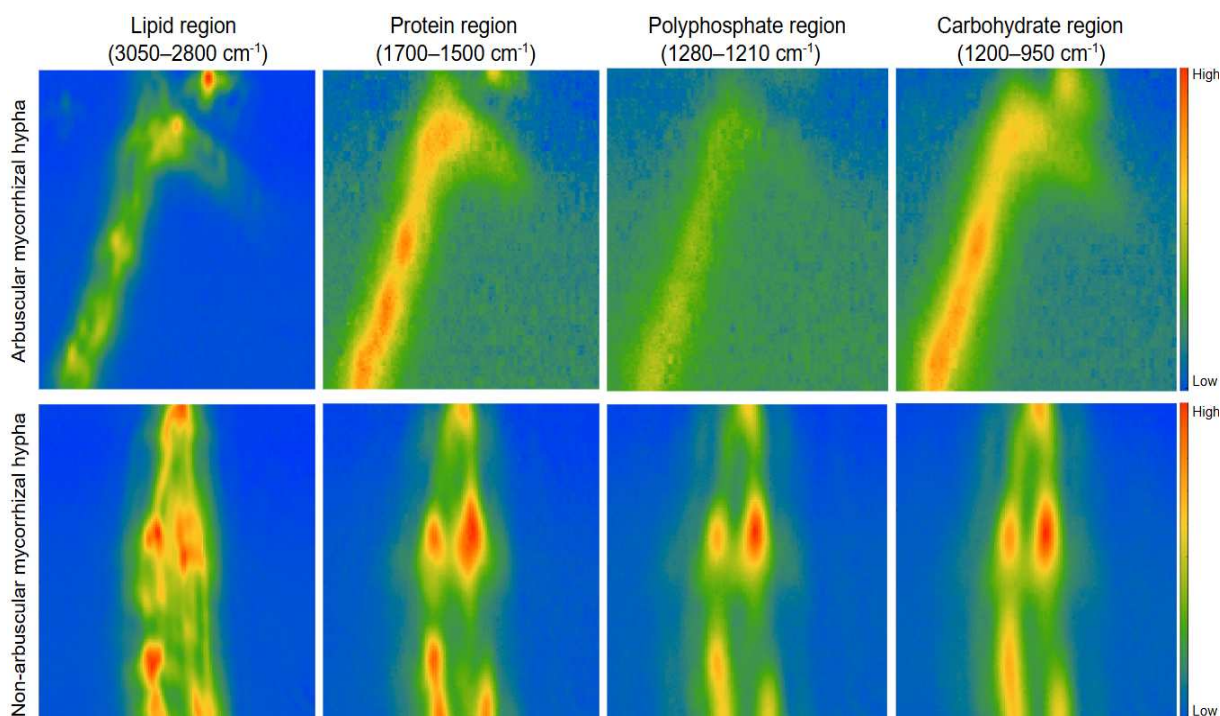


Figura 2.8 Imagens hiperespectrais FPA-FTIR. Sendo hifa de fungo micorrízico arbuscular (FMA) e hifa de fungo não-MA. Barras com denominações “High” e “Low” indicam a escala de intensidades de absorbância nos mapas hiperespectrais, sendo alta intensidade, “High”, em vermelho e baixa, “Low”, em azul.

Na análise pelo modo de transmissão da hifa de FMA, foi possível extrair mais informações devido à melhor qualidade do sinal em relação ao modo de refletância (Fig. 2.9). A distribuição dos compostos seguiu a tendência dos resultados observados no modo de refletância. Os lipídios se distribuíram ao longo do comprimento da hifa de forma heterogênea. As regiões com menor intensidade de lipídios se posicionaram como canais alongados de forma longitudinal no comprimento da hifa (Fig. 2.9). As proteínas se distribuíram principalmente em regiões próximas às bordas laterais da hifa, se sobrepondo às regiões de lipídios (Fig. 2.9). No ápice da hifa, a intensidade para proteínas foi menor do que em suas laterais. Nesta posição também ocorreu menor intensidade de lipídios e polyP (Fig. 2.9). A distribuição de polyP pareceu coincidir com a de proteínas, porém em menor intensidade e com distribuição mais heterogênea (Fig. 2.9). Já os carboidratos se distribuíram em todo o comprimento da hifa de forma homogênea (Fig. 2.9).

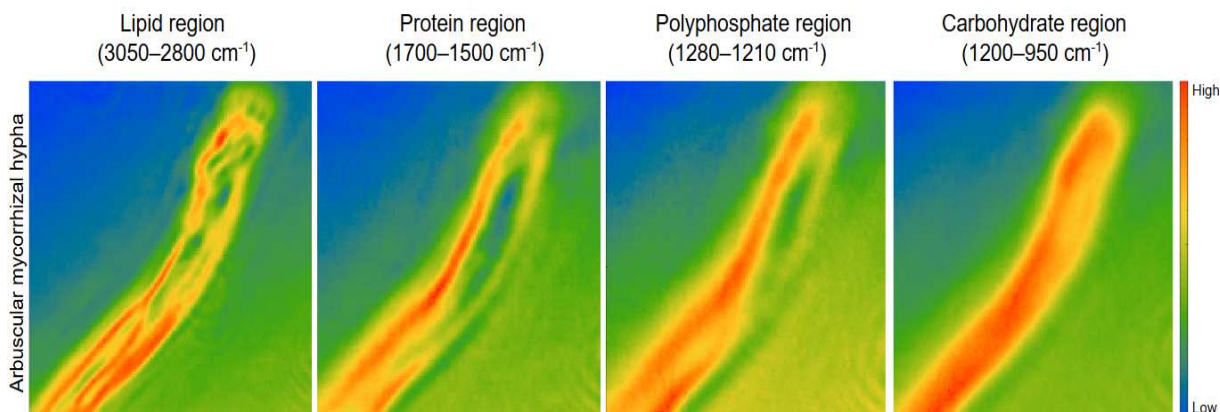


Figura 2.9 Imagens hiperespectrais FPA-FTIR de hifa de FMA no modo transmissão. Sendo a, região dos lipídios, 3000 a 2800 cm⁻¹, b, região das proteínas, 1700 a 1500 cm⁻¹, c, região do polifosfato, 1280 a 1210 cm⁻¹, d, região dos carboidratos, 1200 a 1000 cm⁻¹. Barras com denominações “High” e “Low” indicam a escala de intensidades de absorbância nos mapas hiperespectrais, sendo alta intensidade, “High”, em vermelho e baixa, “Low”, em azul.

Ao obter o espectro médio de hifas extrarradiculares de FMA pelo modo transmissão, foi possível delimitar regiões de importância e identificar os principais picos presentes (Fig. 2.10). Na região de lipídios houve a presença de um pico em 2900 cm⁻¹ e outro, de menor intensidade, em 3030 cm⁻¹ (Fig. 2.10). Este último está relacionado a vibrações do grupo =C-H e remete ao índice de insaturação dos lipídios (Shapaval et al., 2023). Na região das amidas, o pico de amida I, 1700 a 1600 cm⁻¹, apresentou maior intensidade do que o pico de amida II, que pode ser observado como um ombro na região do 1550 cm⁻¹ (Fig. 2.10). Acima de 1300 cm⁻¹ houve a formação de um pico que compreende uma região mista de compostos, sendo que na banda de 1380 a 1340 cm⁻¹ ocorreu a formação de um ombro, que pode ser devido às vibrações dos grupos CH₂, C-C, C-O, C-H e N-H presentes no polissacarídeo quitina (Shapaval et al., 2023) (Fig. 2.10).

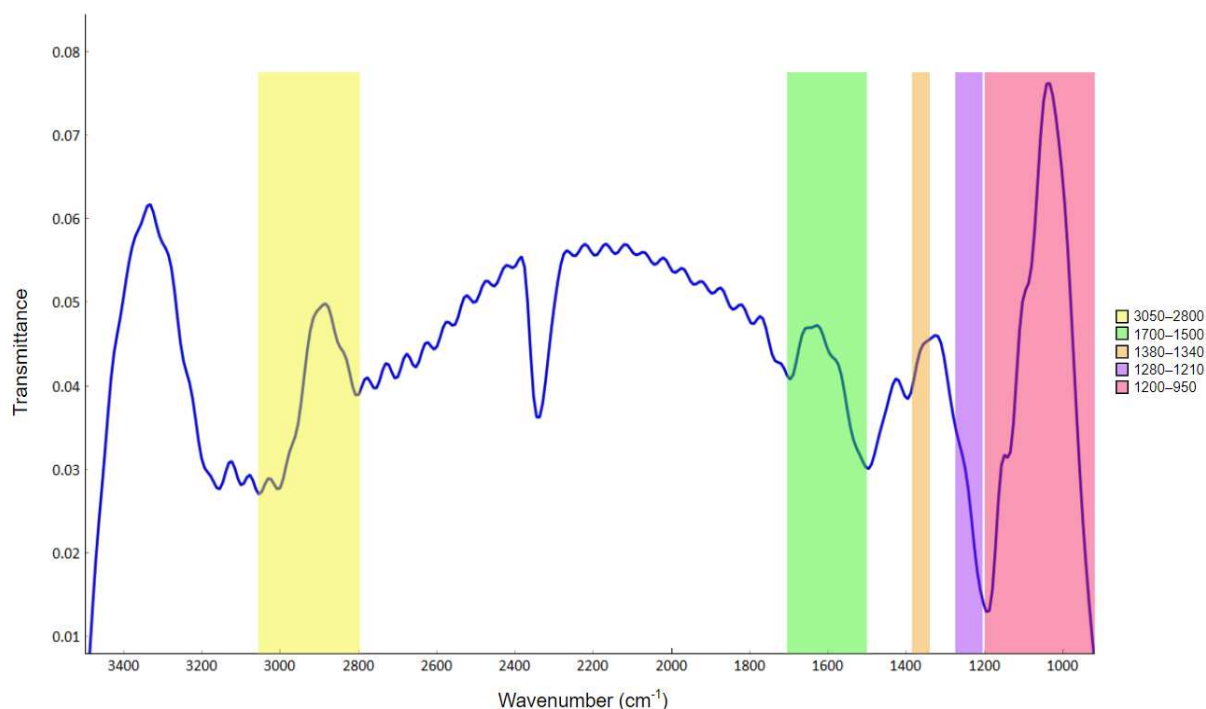


Figura 2.10 Espectro médio de hifas extrarradiculares de FMA no modo transmissão. Regiões de interesse marcadas em amarelo para lipídios, verde para proteínas, alaranjado para quitina, roxo para compostos fosfatados e rosa para carboidratos.

Na banda de fosfato, 1280 a 1210 cm^{-1} , também houve formação de um ombro, que pode estar associado às vibrações dos grupos PO_4^{2-} e PO_4^{3-} , presentes no polyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios (Fig. 2.10). A presença de carboidratos foi bastante marcada pelo pico que se formou entre os números de onda 1200 e 950 cm^{-1} , no qual houve três principais elevações, em 1020 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} e 1150 cm^{-1} , que podem evidenciar respectivamente a presença de ligações C-O-C, C-O, C-O e C-OH, comuns em sacarídeos como glicose, glicogênio e glucanos, C-O-C, PO_4^{2-} , P-O-C, que ocorrem em polissacarídeos e compostos fosfatados e C-O e PO_4^{3-} , que podem estar presentes em carboidratos e moléculas como o polyP e fosfolipídios (Movasaghi et al., 2008; Shapaval et al., 2023) (Fig. 2.10).

2.4 Discussão

2.4.1 Validação dos protótipos do sistema porta-amostras

O principal desafio no desenvolvimento dos sistemas foi a contaminação das microplacas por fungos não-MA. Devido às características morfológicas de estruturas encontradas no interior do córtex radicular das plantas analisadas após a abertura dos sistemas, há possibilidade dessas hifas serem pertencentes a fungos do tipo *dark septate*

endophyte (DSE). Apesar das tentativas de otimizar o processo de montagem dos sistemas, eliminando as possíveis fontes de contaminação, não foi possível evitá-la e nos protótipos houve a presença de hifas melanizadas, finas, septadas e de crescimento profuso, muito similares às de DSE (Jumpponen e Trappe, 1998). Além disso, em alguns casos também houve a presença significativa de hifas intrarradiculares e estruturas reprodutivas de DSE no córtex radicular das plantas utilizadas nos sistemas.

Os DSE são um grupo parafilético de fungos de solo pertencente ao filo Ascomycota que têm a capacidade de colonizar o interior de raízes de plantas sem causar doenças, podendo crescer de forma biotrófica ou saprofítica (Jumpponen e Trappe 1998; Mandyam e Jumpponen, 2015). Esses fungos possuem hifas septadas, finas e melanizadas, sendo a melanina um pigmento com função na proteção contra patógenos e resistência à diversas condições de estresse ambiental (Mandyam e Jumpponen, 2015).

Nas plantas, os DSE podem desde estabelecer uma relação mutualista como fungos promotores de crescimento, além de auxiliar no aumento da resistência a condições de estresse e na melhora na absorção de nutrientes, já que as hifas externas desses microrganismos podem atuar na decomposição da matéria orgânica do solo liberando nutrientes que podem ser absorvidos posteriormente pela planta (Mandyam e Jumpponen, 2015; Newsham, 2011; Ruotsalainen et al., 2022; Huertas et al., 2024). Entretanto, em alguns casos a presença dos DSE nas raízes pode causar prejuízos à planta, já que também consomem carboidratos advindos do metabolismo vegetal (Mayerhofer et al., 2012; Mandyam e Jumpponen, 2015; Ruotsalainen et al., 2022).

Mesmo em casos em que não foi notada a ocorrência de hifas melanizadas, finas e septadas e/ou microescleródios e conídios colonizando o córtex intrarradicular das plantas, foi reportada a presença de hifas extrarradiculares com morfologia típica dos fungos não-MA nos espaços interiores das microplacas dos sistemas em que as plantas hospedeiras permaneceram vivas até o término dos experimentos. Apesar da esterilização dos materiais que foram utilizados para a montagem e condução dos sistemas, a desinfecção superficial das sementes antes da semeadura, o crescimento das plantas em câmara de germinação, ou usando ou não *sunbags* para evitar contaminação pelo ar, não foi possível eliminar completamente o desenvolvimento desses fungos nos sistemas.

O único insumo utilizado não livre de outros microrganismos foram os próprios inóculos de FMA. Tanto o inóculo comercial, quanto o obtido em vasos de multiplicação podem ter introduzido outros fungos nos sistemas preparados. A fácil propagação de fungos ascomicetos, que possuem reprodução sexuada, assexuada ou vegetativa, pode ter contribuído para o seu rápido crescimento nas raízes e nas superfícies dos sistemas (Jumpponen e Trappe 1998).

Os esporos advindos da reprodução sexual são produzidos nos ascomas, já a reprodução assexuada pode ser por fragmentação a partir de fragmentos de hifas, ou a partir da esporulação por meio da produção de conidiósporos, sendo que esses propágulos podem ser transportados por longas distâncias em ambientes naturais, por meio da água ou do vento, ou por insetos e outros animais presentes no solo (Jumpponen e Trappe 1998; Mandyam e Jumpponen, 2015). Esses esporos são estruturas altamente resistentes, que podem permanecer em estado de dormência quando em condições desfavoráveis, germinando posteriormente em condições mais propícias (Jumpponen e Trappe 1998; Wang, 2009; Fracchia et al., 2011). A presença de fungos endofíticos no endosperma de sementes tem sido relatada para várias espécies, podendo remodelar por transferência vertical o microbioma da rizosfera após a germinação e estabelecimento da plântula (Verma et al., 2021; Ran et al., 2024). Entre esses fungos tem sido relatada a presença consistente de Ascomycota (Ran et al., 2024).

Estudos que exigem reduzir os níveis de contaminação precisam manter as condições de crescimento altamente controladas, além de experiência técnica especializada. Alguns estudos com FMA em ambientes axênicos utilizam culturas *in vitro* de raízes transformadas como hospedeiras de FMA (Cranenbrouck et al., 2005; Kokkoris e Hart, 2019). Em geral, raízes transformadas são de mais fácil manipulação e expõe o sistema a menos fontes de contaminação. Além disso, a desinfecção superficial das sementes pode não ser efetiva para eliminar possíveis microrganismos contaminantes. Há evidências da presença de fungos endofíticos na fase embrionária da planta, na qual esporos presentes no endosperma ou em camadas mais profundas do pericarpo da semente pode germinar e colonizar o interior das raízes em desenvolvimento (Sawkaa e Nakashima, 2004; Samreen et al., 2022).

Ao optar pelo uso de uma planta inteira para a elaboração dos sistemas, o propósito foi o de reproduzir a condição natural da simbiose micorrízico arbuscular, para construir um modelo que possibilite estudos como a transferência de nutrientes através das hifas, que muito depende da interação com a planta hospedeira. Futuros trabalhos que busquem o nível de assepsia necessário, devem utilizar plantas e fontes de inóculo cuidadosamente selecionados e manipulados.

Dessa maneira, o principal objetivo deste capítulo não foi alcançado após o desenvolvimento dos oito sistemas realizados. Apesar disso, o tipo de sistema e procedimentos realizados podem ser de utilidade para estudos futuros que procurem implementar um sistema simples. O crescimento de hifas extrarradiculares de FMA em superfícies sem meio de cultura, como os substratos de Au, ainda não foi observado, abrindo a possibilidade de serem realizadas outras tentativas, sob condições axênicas mais

estritas, por exemplo. Quanto ao cultivo de plântulas em sistemas compactos, com delimitação do espaço, e ao crescimento de raízes micorrizadas durante o tempo de experimentação, os resultados foram positivos, já que os índices de colonização intrarradicar se mantiveram estáveis após a abertura das placas.

2.4.2 Análises μ -FTIR: estrutura e composição química das hifas

Ao analisar as hifas extrarradiculares de FMA e de fungos não-MA, possivelmente do grupo dos DSE, foi possível traçar semelhanças e diferenças em sua composição e organização composicional. As hifas de fungos não-MA apresentam padrão de distribuição espacial dos compostos analisados associado à sua estrutura septada. Além disso, foi possível identificar a presença de proteínas e lipídios, bem como de um pico relacionado à melanina ($1330\text{--}1360\text{ cm}^{-1}$), o que condiz com a organização da parede celular dos ascomicetos, uma vez que esse pigmento se encontra principalmente localizado extracelularmente, na parede celular ligado à estrutura da quitina ou do quitosano (Singla et al., 2021).

A comparação entre os espectros dos dois tipos de fungos permitiu evidenciar características dos FMAs que raramente são abordadas na literatura. Além da transferência de glicose e outras hexoses da planta hospedeira para o FMA na interface simbiótica do arbúsculo, a planta também fornece ácidos graxos (AGs) ao FMA, uma vez que eles não possuem a capacidade de sintetizá-los *de novo* (Luginbuehl et al., 2017). Sendo assim, a produção dos lipídios fúngicos necessita estritamente da transferência de AGs advindos do metabolismo da planta (Luginbuehl et al., 2017). Os FMA, de uma maneira geral, possuem conteúdos significativos de lipídios, sendo os AGs neutros $16:1\omega5$ e $18:1\omega7$, os seus principais componentes (Beilby e Kidby, 1980; Olsson e Johansen, 2000).

Os lipídios estão presentes nas membranas celulares e das organelas, mas também são transportados por meio de gotículas que circulam ao longo do citoplasma das hifas cenocíticas dos FMAs (Cooper e Lossel, 1978; Bago et al., 2002; Kobae et al., 2014; Keymer et al., 2017; Sugiura et al., 2020). Esses fungos acumulam triacilglicerol (TAG) como forma de armazenamento de carbono, de forma que ele é exportado do micélio intrarradicar para o micélio extrarradicar através das hifas, sendo consumido à medida que se movimenta para as extremidades (Kameoka e Gutjahr, 2022). A partir das imagens hiperespectrais foi possível notar que os lipídios se distribuíram ao longo da hifa de maneira heterogênea. As regiões de maior acúmulo de lipídios possivelmente se devem à presença de gotículas lipídicas, que transportam TAG através do citoplasma. É possível que os espaços em que há menor presença desses compostos, sejam ocupados pelos vacúolos do

FMA ou outras organelas, uma vez que o transporte preferencial dos lipídios ocorre por gotículas no citoplasma.

A parede celular das hifas extrarradiculares do FMA possui componentes como a quitina, polissacarídeos e proteínas, como a glomalina. A glomalina é um complexo de glicoproteínas que se adere à parede celular das hifas, formando ligações covalentes ou não com outros polímeros (Bonfante-Fasolo e Grippo, 1984; Driver et al., 2005). Isso a torna uma proteína que tem a capacidade de se ligar fortemente ou frouxamente à parede celular, podendo exercer funções fisiológicas ao longo da vida dos FMAs, por exemplo repelindo a água ao seu redor e permitindo que suas hifas se fixem às superfícies do solo, ou mesmo atuando de forma indireta, imobilizando poluentes no solo ou na formação de microagregados (Rillig e Steinberg, 2002; Driver et al., 2005).

Além da glomalina existem outras proteínas associadas à parede celular dos FMA, como enzimas e proteínas transmembranas (Recorbet et al., 2009). No citoplasma das hifas também ocorrem proteínas, bem como no interior de vacúolos, onde é possível encontrar proteínas e enzimas associadas ao transporte de moléculas, transdução de sinais e à síntese de material genético (Recorbet et al., 2009). Portanto, as proteínas observadas nas hifas de FMA podem estar localizadas em diversas regiões da hifa, incluindo parede celular, membrana plasmática, mitocôndrias, citoplasma e vacúolos.

De maneira geral, os vacúolos são componentes subcelulares importantes para fisiologia e homeostase dos fungos (Richards et al., 2010). Em FMA, vacúolos tubulares desempenham um papel fundamental no acúmulo de P e em seu transporte sob a forma de polyP (Kikuchi et al., 2014; Ferrol et al., 2019), além de atuarem na compartimentalização celular de toxinas e na translocação de proteínas e moléculas de sinalização celular (Gonzalez-Guerrero et al., 2008; Ferrol et al., 2009; Richards et al., 2010; Ferrol et al., 2019). Como nas hifas de FMA, o polyP é translocado através de vacúolos tubulares, parece possível que nas imagens hiperespectrais, as áreas de maior intensidade de vibrações do grupo PO_4^{3-} sejam relacionadas principalmente à presença destes compostos no interior dos vacúolos.

A distribuição intensa e homogênea de carboidratos ao longo das hifas do FMA, como é possível visualizar nas imagens hiperespectrais, sugere fortemente a presença de carboidratos associados à parede celular. Os FMAs possuem paredes celulares ricas em quitina, um polissacarídeo importante para a proteção, ancoragem de proteínas e sinalização durante as interações planta-fungo (Bonfante et al., 1988; Bago et al. 1996). A quitina é sintetizada por uma quitina sintase transmembrana, localizada subjacente à parede celular, que permite que esse carboidrato seja posicionado no local de sua implantação (Zhang et al., 2024). Além da quitina, a parede celular dos FMA é composta por

glucanos, que são polissacarídeos formados por unidades de glicose e se complexam em ligações covalentes quitina-glucanos, conferindo à parede um caráter altamente insolúvel e compacto (Bonfante et al., 1988; Bago et al., 1996; Bowman e Free, 2006).

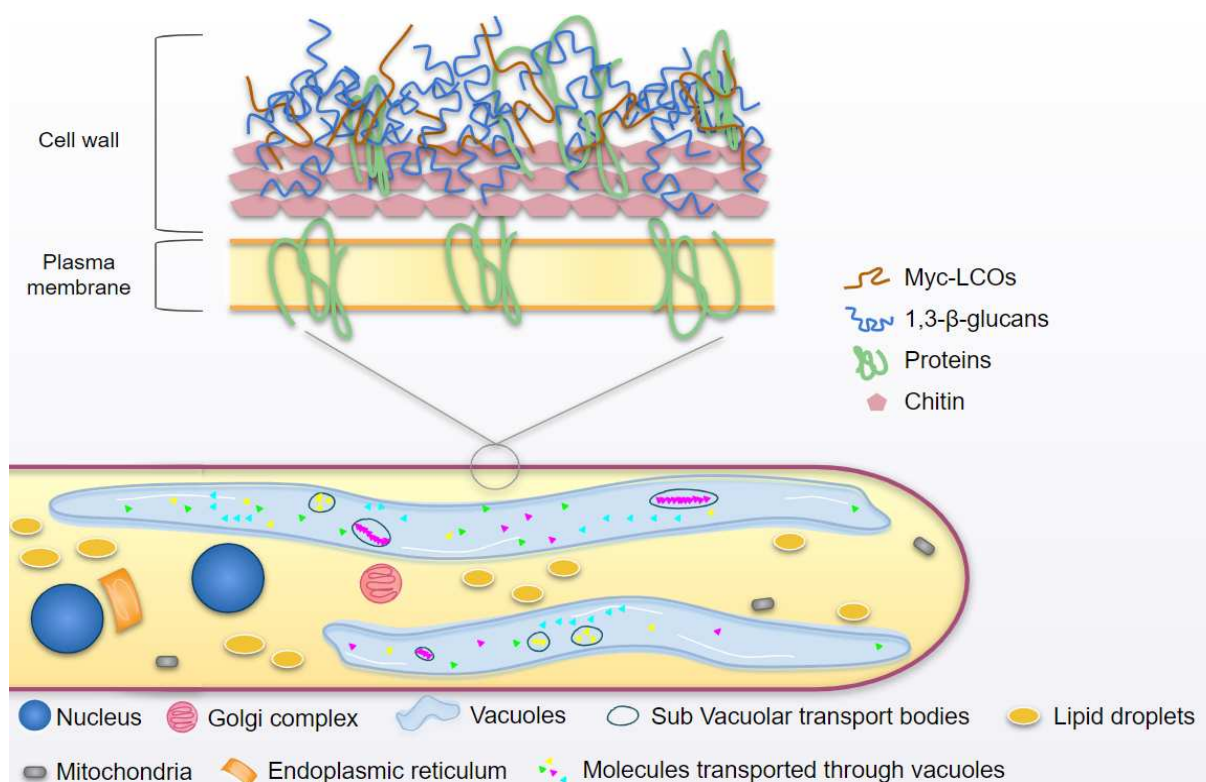


Figura 2.11 Representação esquemática de hifa extrarradicular de fungo micorrízico arbuscular (FMA). Importantes estruturas subcelulares participam do metabolismo e transporte de biomoléculas. Além disso, componentes como polissacarídeos e proteínas constituem a parede celular dos FMAs.

A maior parte dos glucanos dos FMAs é composta pelos β -glucanos, enquanto os β -1,3-glucanos são a forma mais comum de β -glucanos encontrada na parede celular desses fungos (Bowman e Free, 2006). Eles podem ser multi-ramificados e se fixam à parede celular firme ou frouxamente, o que lhes confere propriedades estruturais ou ecofisiológicas, exercendo papel na proteção e na sinalização celular dos FMA (Balestrini e Bonfante, 2014). Além dos β -glucanos, as paredes celulares contam com a presença de lipoquitooligossacarídeos (LCOs), ou Myc-LCOs, que são polissacarídeos derivados da quitina muito importantes no reconhecimento entre a planta e o FMA, atuando como moléculas sinalizadoras na comunicação com a planta hospedeira (Cao et al., 2014; Balestrini e Bonfante, 2014; Fese e Zuccaro, 2016).

A partir dessas observações é possível propor um modelo esquemático dos componentes celulares de hifas extrarradiculares de FMAs (Fig. 2.11). Por serem organismos altamente especializados para viver em simbiose com um hospedeiro vegetal,

os FMA possuem um complexo sistema de transporte de moléculas que inclui gotículas lipídicas, sistemas de vacúolos e proteínas de síntese e arranjo de polissacarídeos de parede. Quitina, glucanos e Myc-LCOs atuam tanto na estrutura, quanto na fisiologia dos FMA, sendo importantes características que os diferenciam de outros fungos.

2.5 Conclusão

Apesar do desenvolvimento de oito sistemas e de tentativas consecutivas de otimizar o processo a cada nova montagem, as fontes de contaminação não foram eliminadas. Não foi possível evitar a ocupação dos espaços ao redor das raízes e no interior das microplacas por hifas extrarradiculares de fungos não-MA, possivelmente DSE, ou mesmo a colonização intrarradicular das plântulas por fungos DSE. Para futuros trabalhos com os mesmos objetivos é necessário haver nível de assepsia mais rigoroso, como ambientes axênicos e corpo técnico especializado, além de equipamentos e materiais totalmente dedicados ao mesmo experimento. Sendo assim, ainda não foi observado o crescimento de hifas extrarradiculares de FMAs sobre superfícies singulares, como o é o caso dos substratos de Au. Isso abre a possibilidade de que novas tentativas sejam realizadas, uma vez que os sistemas desse experimento não foram desenvolvidos em ambientes totalmente estéreis ou mesmo com inóculos de FMAs e sementes de plantas selecionadas para tal finalidade.

Por outro lado, com o conjunto de técnicas elaborado para a montagem dos sistemas, foi possível estabelecer o cultivo de plântulas micorrizadas por *R. irregularis* em ambientes compactos e com a delimitação do crescimento das raízes. Dessa forma os procedimentos até então realizados podem ser úteis para futuros estudos que dependam do confinamento em pequenos espaços de plantas micorrizadas. Em relação às análises por μ -FTIR, até o presente momento não foram encontrados na literatura trabalhos em que a comparação entre dados hiperespectrais de hifas extrarradiculares de FMAs e de fungos não-MA foi realizada. Os resultados obtidos a partir das análises por μ -FTIR podem ser interessantes referências para a identificação de diferentes espécies de fungos a partir de suas características espectrais. Além disso, as análises por μ -FTIR possibilitaram a elaboração de um modelo que propôs a organização intracelular e o arranjo da parede celular de hifas extrarradiculares de FMAs, baseando-se em sua composição química por meio de dados espectrais.

Capítulo 3. Análise de hifas extrarradiculares de FMA frente à exposição ao Mn e variações na concentração de P durante a associação micorrízico arbuscular

Analysis of AMF extraradical hyphae when exposed to Mn and variations in P concentration during the arbuscular mycorrhizal association

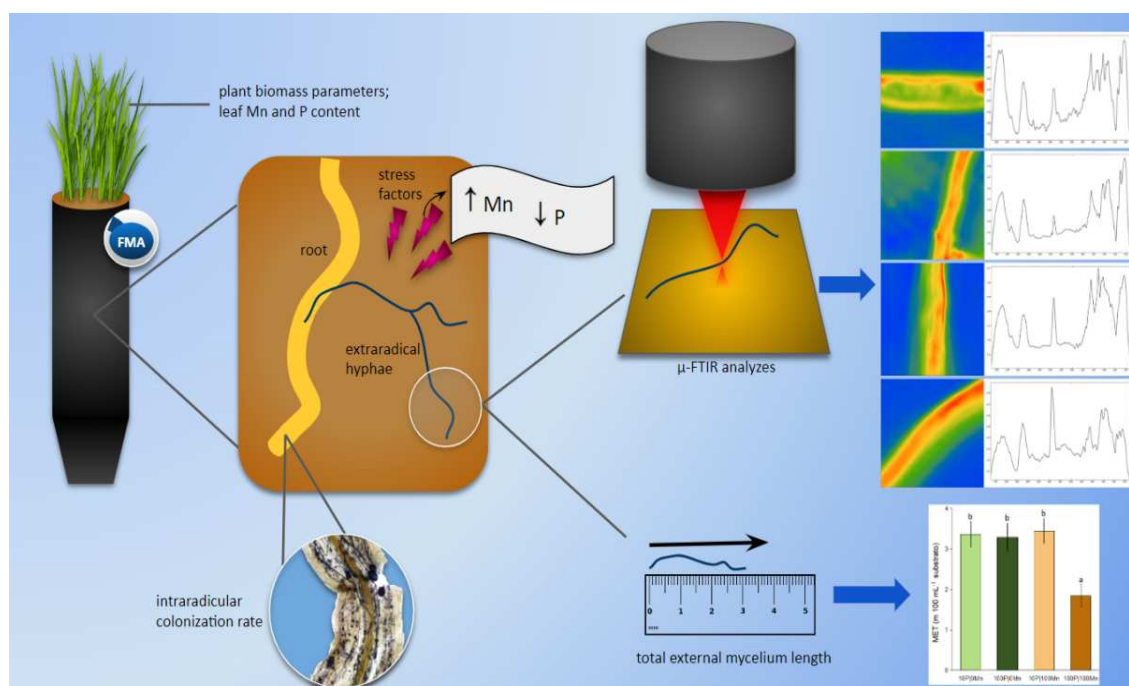


Figura 3.1 Resumo gráfico do capítulo. Plântulas de *Urochloa decumbens* inoculadas com *Rhizophagus irregularis* sob exposição ao Mn (100 μ M) e duas concentrações de P (10 and 100 μ M). Hifas extrarradiculares foram analisadas por μ -FTIR e o comprimento do micélio externo total foi avaliado, assim como os parâmetros de colonização intrarradicular. A produção de biomassa da planta e acúmulo de Mn e P na parte aérea também foram analisados.

Resumo

A associação entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) pode mitigar os efeitos negativos da exposição ao manganês (Mn) em plantas. No entanto, há poucos estudos focados nos impactos deste estresse ambiental diretamente sobre os FMAs, especialmente em relação ao micélio extrarradicular. Neste trabalho, utilizou-se a microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR) para localizar e caracterizar compostos químicos presentes nas hifas extrarradiculares de *Rhizophagus irregularis*, além de avaliar mudanças em seu perfil composicional sob os efeitos da exposição direta ao Mn em dois níveis de fósforo (P) quando em associação com a planta hospedeira *Urochloa decumbens*. Foram avaliados o comprimento total do micélio extrarradicular e a colonização intrarradicular dos FMAs, além da produção de biomassa e o acúmulo de P e Mn na planta hospedeira. Os resultados mostraram que a extensão do

micélio externo de *R. irregularis* foi reduzida quando exposto ao Mn (100 μ M), mas somente em conjunto à concentração de 100 μ M de P. A partir dos espectros obtidos pela técnica μ -FTIR, a razão entre lipídios e carboidratos foi negativamente correlacionada com a extensão do micélio externo. Também na condição de Mn e P, ambos a 100 μ M, as hifas apresentaram maior intensidade de absorbância no pico associado ao comprimento das cadeias lipídicas, 2900 cm^{-1} . As imagens hiperespectrais obtidas no modo FPA-FTIR indicaram distribuição homogênea para os compostos na faixa de carboidratos, 1200–950 cm^{-1} , para as hifas extrarradiculares de todos os tratamentos, sugerindo que nesta região espectral são evidenciados principalmente componentes da parede celular do fungo.

Palavras-chave: hifas extrarradiculares; manganês; disponibilidade de fósforo; polifosfato; parede celular fúngica; μ -FTIR.

Abstract

The association between plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can mitigate the negative effects of manganese (Mn) exposure in plants. However, there are few studies focused on the impacts of this environmental stress directly on AMF, especially in relation to extraradical mycelium. In this work, Fourier transform infrared microspectroscopy (μ -FTIR) was used to locate and characterize chemical compounds present in the extraradical hyphae of *Rhizophagus irregularis*, in addition to evaluating changes in their compositional profile under the effects of high Mn concentration and low phosphorus (P) levels when in symbiosis with the host plant *Urochloa decumbens*. The total length of the extraradical mycelium and the intraradical colonization of AMF were evaluated, in addition to the biomass production and the accumulation of P and Mn in the host plant. The results showed that the extension of the external mycelium of *R. irregularis* was reduced when exposed to Mn (100 μ M), but only in conjunction with a concentration of 100 μ M P. From the spectra obtained by the μ -FTIR technique, the ratio between lipids and carbohydrates was negatively correlated with the extension of the external mycelium. Also in the condition of Mn and P, both at 100 μ M, the hyphae presented greater absorbance intensity in the peak associated with the length of the lipid chains, 2900 cm^{-1} . The hyperspectral images obtained in the FPA-FTIR mode indicated a homogeneous distribution for the compounds in the carbohydrate range, 1200–950 cm^{-1} , for the extraradical hyphae of all treatments, suggesting that in this spectral region mainly components of the fungal cell wall are evidenced.

Keywords: extraradicular hyphae; manganese; phosphorus availability; polyphosphate; fungal cell wall; μ -FTIR.

3.1 Introdução

A elevada disponibilidade de manganês (Mn) nos solos pode ser um problema ocasionado por atividades antrópicas, o que inclui, mineração, siderurgia e até mesmo a queima de combustíveis fósseis, entretanto este também pode ser um problema de origem natural, como no caso de solos ácidos altamente intemperizados em regiões de clima tropical e subtropical, bem como em solos originários de rochas magmáticas básicas (Howe 2004; Kabata-Pendias e Mukherjee, 2007; Suppi et al., 2018). Os solos ácidos podem apresentar alta disponibilidade de Mn e outros metais, como o alumínio, tornando o ambiente tóxico para diversas espécies vegetais (Chatzistathis et al., 2015).

Nas plantas, o excesso de Mn causa danos ao aparato fotossintético, levando à diminuição da assimilação de carbono, do conteúdo de clorofila e, por consequência, do crescimento vegetal (Millaleo et al., 2010). Já em fungos, como *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a exposição direta ao Mn pode levar ao desequilíbrio iônico, danos oxidativos, e à regulação negativa de genes relacionados ao metabolismo de histidina, o que acarreta alterações na cromatina e interrupção do ciclo celular (Liang e Zhou, 2007; Robinson et al., 2021).

Apesar de potencialmente tóxico, o também Mn é um nutriente essencial para os seres vivos e muitas enzimas utilizam sua forma iônica Mn^{2+} como cofator em reações bioquímicas (Robinson et al., 2021). Nos fungos, essas enzimas podem estar localizadas no citoplasma, no complexo de Golgi e nas mitocôndrias (Li et al., 2021). Elas participam de diversos processos importantes para a fisiologia dos fungos, como a superóxido dismutase (MnSOD), por exemplo, que atua em resposta ao estresse oxidativo (Pittman, 2005; Li et al., 2021; Robinson et al., 2021). Também há enzimas que participam da síntese de proteínas, fatores de virulência e de outras biomoléculas, como por exemplo as RNA polimerases (Pittman, 2005; Li et al., 2021; Robinson et al., 2021).

A associação entre plantas e FMA pode atenuar os efeitos negativos de diferentes estresses ambientais nas plantas, incluindo os causados por temperaturas extremas, salinidade, deficiências ou desequilíbrios nutricionais, exposição a metais pesados, dentre outros (Evelin et al., 2009; Miransari, 2011; Sheng et al., 2008; Li et al., 2014; de Andrade et al., 2015; Zhang et al., 2020). Entretanto, estudos que enfatizem os efeitos do estresse ambiental nos próprios FMA são escassos, principalmente relacionados diretamente ao micélio extrarradicular.

Alguns trabalhos já mostraram que altas concentrações de Mn podem reduzir a germinação de esporos de FMAs, bem como o estabelecimento das hifas no interior de raízes hospedeiras, sugerindo que o Mn pode causar efeitos tóxicos nos FMAs (Nogueira et

al., 2004; De Oliveira et al., 2022; De Oliveira et al., 2023). A micorriza arbuscular em *Eucalyptus grandis* pode atuar na mitigação do estresse causado por condições de excesso de Mn e baixa disponibilidade de P, levando à melhora da absorção de P e favorecendo o crescimento das plantas (De Oliveira et al., 2022). A simbiose com FMA também se mostrou favorável na mitigação da toxicidade do Mn em plântulas de *E. tereticornis*, causando a redução do acúmulo de Mn na parte aérea das plantas e a regulação da expressão de genes associados a transportadores de Mn, principalmente em condições de baixa disponibilidade de P (De Oliveira et al., 2023).

Para o melhor entendimento dos efeitos do estresse abiótico em FMA, além de estudos relacionados às respostas associadas ao hospedeiro vegetal, são necessárias pesquisas que viabilizem as respostas do parceiro fúngico (Lenoir et al., 2016; Leyva-Morales et al., 2018; Zou et al., 2020). Por serem de difícil cultivo e crescimento *in vitro* (Cha e Eom, 2023), biotróficos obrigatórios e dependentes de seus parceiros vegetais, o estudo de características fisiológicas dos FMAs torna-se um desafio para a maioria dos laboratórios que dependem de técnicas de cultivo mais tradicionais.

A técnica de microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR) permite localizar componentes e caracterizar compostos químicos presentes em amostras biológicas sem a utilização de marcadores ou corantes, preservando as estruturas originais dos analitos (Szeghalmi et al., 2007). Em um estudo com o fungo *Sclerotium rolfsii* sob estresse térmico, por exemplo, dados obtidos por espectroscopia FTIR revelaram maior conteúdo de lipídios nos fungos sob estresse em comparação ao grupo controle (Buensanteai et al., 2012). Em outra utilização de análise por espectroscopia FTIR, ainda envolvendo o fitopatógeno *S. rolfsii*, foi possível demonstrar como o cromo (Cr) afeta o crescimento e a viabilidade deste fungo se ligando em grupos hidroxila, carboxila e amina presentes em sua composição química (Rafi et al., 2016). Levando esses aspectos em consideração, a μ -FTIR é uma interessante possibilidade para estudo dos FMAs, já que permite análises acuradas de sua composição química e ainda da localização de diferentes grupos moleculares, algo ainda pouco explorado nos FMAs.

Portanto, este trabalho teve como objetivos avaliar: 1) as mudanças no perfil composicional de hifas extrarradiculares do FMA *Rhizophagus irregularis* submetidas a estresse por exposição da planta hospedeira *Urochloa decumbens* ao Mn (100 μ M) e diferentes concentrações de P (10 e 100 μ M) durante a associação micorrízico arbuscular; e 2) os efeitos dessas condições na colonização intra e extrarradicular e a produção de biomassa e acúmulo de P e Mn na planta hospedeira. As hipóteses levantadas foram: i) os estresses causados pela exposição direta ao Mn e o déficit nutricional causariam alterações bioquímicas nas hifas extrarradiculares do FMA relacionadas a danos nas membranas,

alterações na parede celular, síntese de proteínas, carboidratos ou lipídios; ii) o estresse da planta ocasiona estresse ao FMA, reduzindo a colonização intra e extrarradicular, o que pode reduzir a transferência de P para o hospedeiro e, potencialmente, a transferência de carboidratos e lipídios para o fungo.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Delineamento experimental

Foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação com delineamento experimental casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, somando 24 parcelas experimentais. Os tratamentos consistiram na aplicação de quatro soluções nutritivas às plantas, denominadas como segue: “10P|0Mn”, “100P|0Mn”, “10P|100Mn” e “100P|100Mn”, 10P e 100P correspondem a 10 e 100 μM de P, respectivamente, e 0Mn e 100Mn a 0 e 100 μM de Mn, respectivamente. O tratamento 100P|0Mn foi estabelecido como base de comparação para os demais. O Mn e o P foram adicionados na forma de solução aquosa, utilizando como fonte de Mn o cloreto de Mn tetra hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e como fonte de P o fosfato monopotássico (KH_2PO_4), levando em consideração as faixas de teores de nutrientes condizentes com a espécie vegetal em estudo (Instituto Agronômico de Campinas, 2022).

3.2.2 Materiais biológicos e condições de crescimento

A espécie *Urochloa decumbens*, foi utilizada como planta hospedeira e *Rhizophagus irregularis* como espécie de FMA. O experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação entre os meses de setembro e outubro de 2022 em Campinas (22°49'38"S 47°04'12.88"W), São Paulo, Brasil. De cinco a seis sementes de *U. decumbens*, previamente desinfestadas superficialmente (10 min, NaClO 2,5%), foram semeadas em tubetes plásticos preenchidos com 100 mL de areia esterilizada em autoclave (2 ciclos de 1 h a 120 °C, 1 atm). Após a germinação foram mantidas duas plantas por tubete. Cada tubete com duas plantas foi considerado uma parcela experimental.

Como inóculo de *R. irregularis* foi utilizado o produto comercial Rootella BR® (NovaTero, Joinville – Santa Catarina, Brasil). Cerca de 0,1 g do produto, contendo aproximadamente 20.800 propágulos, de acordo com o comerciante, foi polvilhado junto às sementes no momento do plantio. As plantas foram irrigadas com as soluções com Mn e P de acordo com cada tratamento e com água ultrapura, quando necessário. Um volume de 5

mL das soluções de P e Mn foi aplicado duas vezes por semana, por 30 dias, iniciando no quinto dia após a germinação. Com o intuito de limitar a disponibilidade de nutrientes e induzir deficiência nutricional à simbiose, não foram utilizados outros nutrientes durante o experimento. Ao final do período, parte aérea, raízes e a areia de cada parcela experimental foram coletadas.

3.2.3 Determinação da biomassa e das concentrações de P e Mn na parte aérea vegetal

Na coleta, a parte aérea e a raiz foram separadas. A parte aérea das seis repetições por tratamento foram secas em estufa a 60°C e pesadas para determinação da massa da matéria seca. Então cada parcela experimental foi unida em duplas, totalizando três repetições por tratamento, com a finalidade de aumentar a quantidade de massa de material por amostra para a realização das análises. O material foi moído e digerido em solução de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (3:1 v/v), conforme Zasoski e Burau (1977). A concentração de P e Mn nos extratos foi determinada por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES, JobinYvon, JY50P, França).

3.2.4 Biomassa da raiz, parâmetros morfológicos e avaliação da colonização micorrízica

As raízes coletadas foram armazenadas em etanol 50% e utilizadas para análise do comprimento, área superficial e do diâmetro médio ponderado utilizando o software WinRhizo, depois deste procedimento foi retirada uma subamostra para determinação da colonização micorrízica. O restante da matéria fresca de raiz foi seco em estufa a 60° C por 7 dias e pesado. Amostras das raízes armazenadas em etanol 50% foram lavadas em água corrente, diafanizadas em KOH 2,5% por 24 h a temperatura ambiente, coloridas com solução de tinta de tintureiro a 5% em vinagre por 1 h e 20 min (Vierheilig et al., 1998) e armazenadas em glicerol acidificado. Para estimar a porcentagem de raiz colonizada pelo FMA, 30 fragmentos de raiz de 1 cm foram dispostos sobre lâminas de microscopia e observados em microscópio óptico (Leica DFC295) no aumento de 40× a 200×. Foram quantificadas a presença de estruturas como hifas, arbúsculos e vesículas de FMA para determinar a frequência micorrízica (F) de acordo com Trouvelot et al. (1986).

3.2.5 Determinação do comprimento do micélio extrarradicular no substrato

A areia utilizada como substrato presente em cada tubete foi recolhida e dividida em duas porções de 50 ml, uma para a estimativa do comprimento do micélio externo total

(MET) e outra para extração de hifas extrarradiculares para análise do perfil composicional por μ -FTIR. Para estimar o comprimento do MET foi seguido o método de Boddington et al., (1999), com modificações. Os 50 mL de areia foram suspensos em 1500 mL de água, e a mistura foi peneirada em malhas de 0,71 e 0,25 mm, para retirar possíveis fragmentos de raiz e partículas de areia grossa, o volume foi recolhido e agitado vigorosamente em liquidificador por 30 s, após repouso por 2 min, uma alíquota de 500 mL foi peneirada em malha de 0,044 mm e as hifas extrarradiculares de FMA foram recolhidas em 11 mL de água ultrapura. Em seguida, 5 mL da solução resultante foram ressuspensos e filtrados a vácuo em membrana de nitrocelulose com reticulado quadriculado. O MET retido na membrana foi colorido com azul de Tripán 0,05% em glicerol acidificado por 1 min. O comprimento do MET foi avaliado em microscópio óptico (aumento de 125 $\times$) e com o auxílio de uma lente reticulada. Somente hifas com características e morfologia de FMA foram consideradas (Melloni et al., 1999). Os resultados foram expressos em m mL⁻¹ de substrato.

3.2.6 Obtenção de hifas extrarradiculares para análises por μ -FTIR

A extração de hifas extrarradiculares do FMA para a análise por μ -FTIR foi realizada por peneiramento úmido do substrato (Gerdemann e Nicolson, 1963). Para isso, 50 mL de areia foram suspensos em 2000 mL de água, essa solução então foi peneirada por malhas de 0,71, 0,25 e 0,045 mm. Este processo foi repetido dez vezes, e no final, o conteúdo retido na malha de 0,044 mm foi recolhido em 3 mL de água ultrapura. As amostras foram homogeneizadas, despejadas sobre vidro de relógio e levadas ao microscópio estereoscópico. Após a verificação da presença de fragmentos de hifas de FMA, cerca de 80 μ L de amostra foram pipetados sobre lâminas de ouro (Au), chamadas também de substratos porta-amostras, de 5 x 5 mm para análise μ -FTIR no modo de reflectância. As amostras nos substratos de Au foram secas ao ar em caixa dessecadora por pelo menos 24 h.

3.2.7 Análises por μ -FTIR de hifas extrarradiculares de FMA

As análises por μ -FTIR foram realizadas utilizando um espectromicroscópio FTIR (Cary 620, Agilent Technologies). As leituras foram realizadas no modo de reflectância, utilizando um detector do tipo *Focal Plane Array* (FPA), com resolução espectral de 8 cm⁻¹, 256 scans e no modo de alta ampliação (*high magnification*) para melhor resolução espacial. Foram selecionadas hifas com diâmetro variando entre 10 a 20 μ m e com pouco ou nenhum sedimento ao seu redor. Para atenuar a interferência de sinais

decorrentes do Au, foi utilizada uma lâmina limpa de substrato de Au como *background* antes do início das medidas. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, totalizando 12 amostras. Ao menos duas leituras de diferentes fragmentos de hifas extrarradiculares foram realizadas em cada uma das 12 amostras. Os espectros e as imagens hiperespectrais foram processados utilizando o software Orange: Data Mining Toolbox in Python (University of Ljubljana, Slovenia). Realizou-se a correção do *baseline* (modo *Rubber Band*) e a suavização dos espectros utilizando a função *Gaussian Smoothing*. Para a obtenção de espectros médios, os dados de, pelo menos, três hifas por tratamento foram combinados (concatenados).

3.2.8 Análise Estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-knott ($P < 0,05$). Antes das análises estatísticas, os dados expressos em porcentagem foram transformados em raiz quadrada de arco-seno e os dados relativos a contagens transformados em $\log x + 1$. Também foi realizada a correlação de variáveis por análise de correlação de Pearson ($P < 0,05$).

3.3 Resultados

3.3.1 Colonização micorrízica e características biométricas de raiz e parte aérea

A colonização intrarradicular do FMA não foi influenciada significativamente pela disponibilidade de Mn e P na solução, apresentando frequência de colonização média de 26% (Fig. 3.2 a). Contudo, raízes sob 100P|100Mn apresentaram frequência de colonização 55% menor em comparação às raízes em 100P|0Mn (Fig. 3.2 a). Já em relação ao comprimento do MET, foi possível observar diferença significativa em 100P|100Mn, no qual o valor se manteve cerca de 45% menor em comparação aos demais tratamentos (Fig. 3.2 b). Quanto à produção de biomassa de parte aérea e raízes, não houve diferenças significativas entre as plantas de cada tratamento (Fig. 3.3 a-b). A razão raiz: parte aérea foi similar entre os tratamentos, apresentando valor médio de 0,75 (Fig. 3.3 c). Em geral, a disponibilidade de Mn e P não causou alterações significativas no comprimento ou na área superficial das raízes, que apresentaram valores médios de 30 cm e 20 cm², respectivamente (Fig. 3.3 d-e). Quanto ao diâmetro médio das raízes, as plantas sob 10P|100Mn apresentaram valor em torno de 8% maior em comparação ao observado nos demais tratamentos (Fig. 3.3 f).

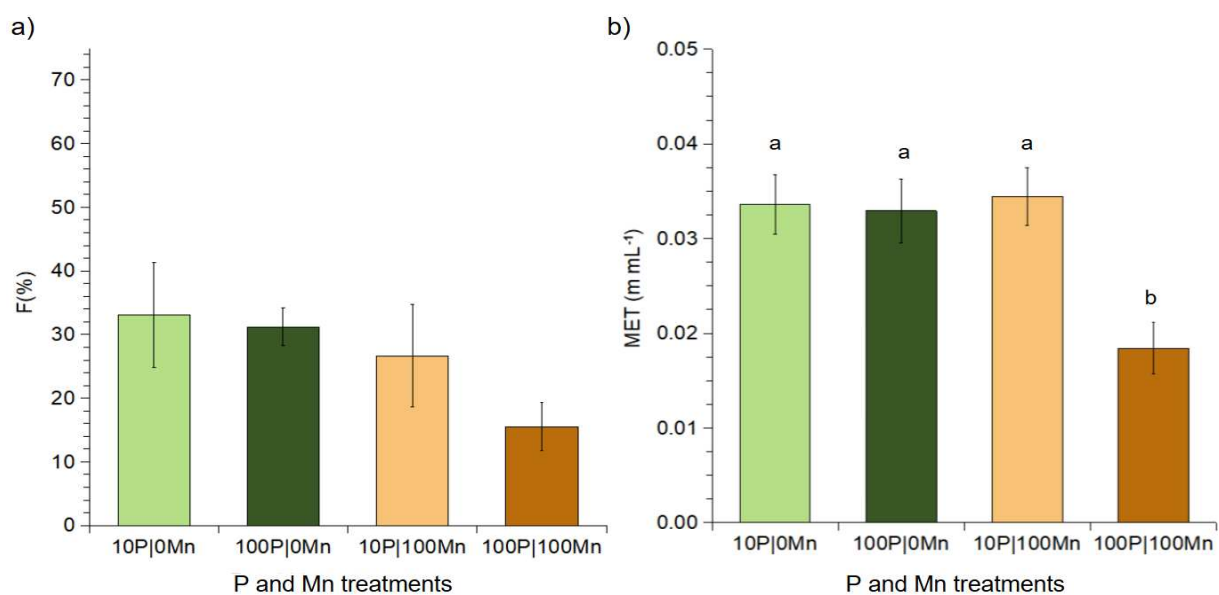
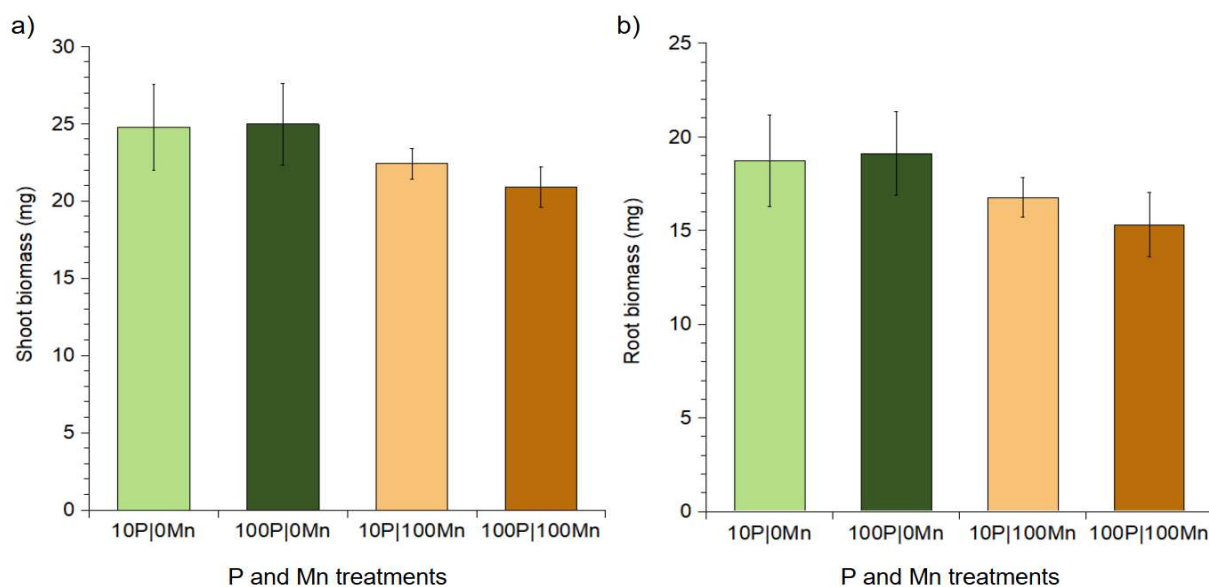


Figura 3.2 Colonização intrarradicular e comprimento do micélio extrarradicular. Frequência (F) da colonização intrarradicular (a) e comprimento total do micélio externo (MET) (b) de plantas de *Urochloa decumbens* inoculadas com *Rhizophagus irregularis* e irrigadas com soluções contendo combinações de 10 (10P) ou 100 (100P) μM de P e 0 (0Mn) ou 100 (100Mn) μM de Mn. Barras indicam erro padrão (n=6). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de P e Mn pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



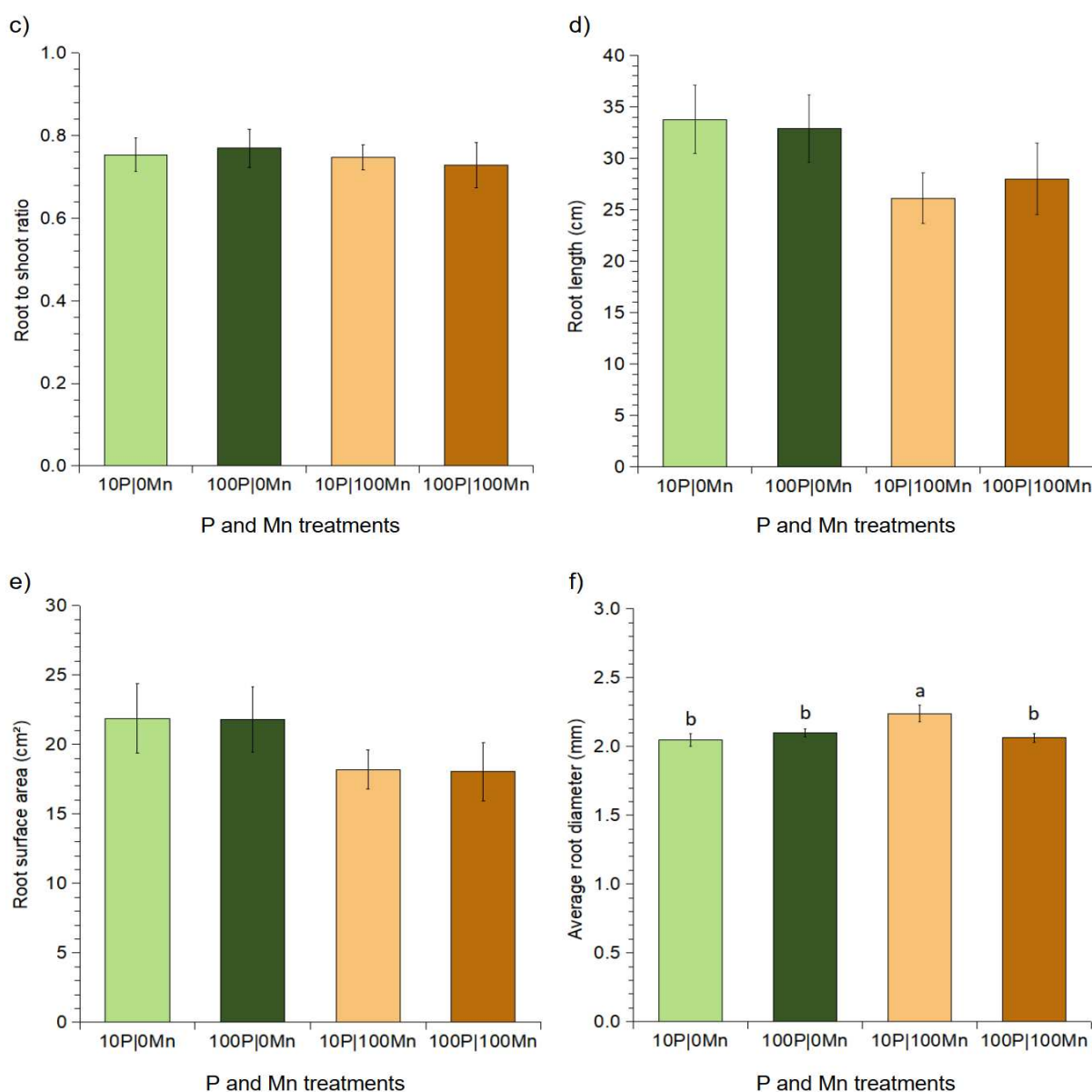


Figura 3.3 Produção de biomassa vegetal. Biomassa da parte aérea (a), biomassa de raiz (b), razão raiz: parte aérea (c), comprimento de raiz (d), área superficial de raiz (e) e diâmetro médio de raiz (f) de plantas de *Urochloa decumbens* inoculadas com *Rhizophagus irregularis* e irrigadas com soluções contendo combinações de 10 (10P) ou 100 (100P) μM de P e 0 (0Mn) ou 100 (100Mn) μM de Mn. Barras indicam erro padrão (n=6). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de P e Mn pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.3.2 Concentração e acúmulo de P e Mn na parte aérea

De maneira geral, a concentração de P na parte aérea das plantas não sofreu influência significativa da disponibilidade de P e de Mn na solução, variando entre 0,9 e 1,2 g kg^{-1} (Fig. 3.4 a). Quanto à concentração de Mn na parte aérea, as plantas em 10P|100Mn apresentaram o maior valor, sendo esse 56% e 31% maior em comparação ao observado em 10P|0Mn e 100P|100Mn, respectivamente (Fig. 3.4 b).

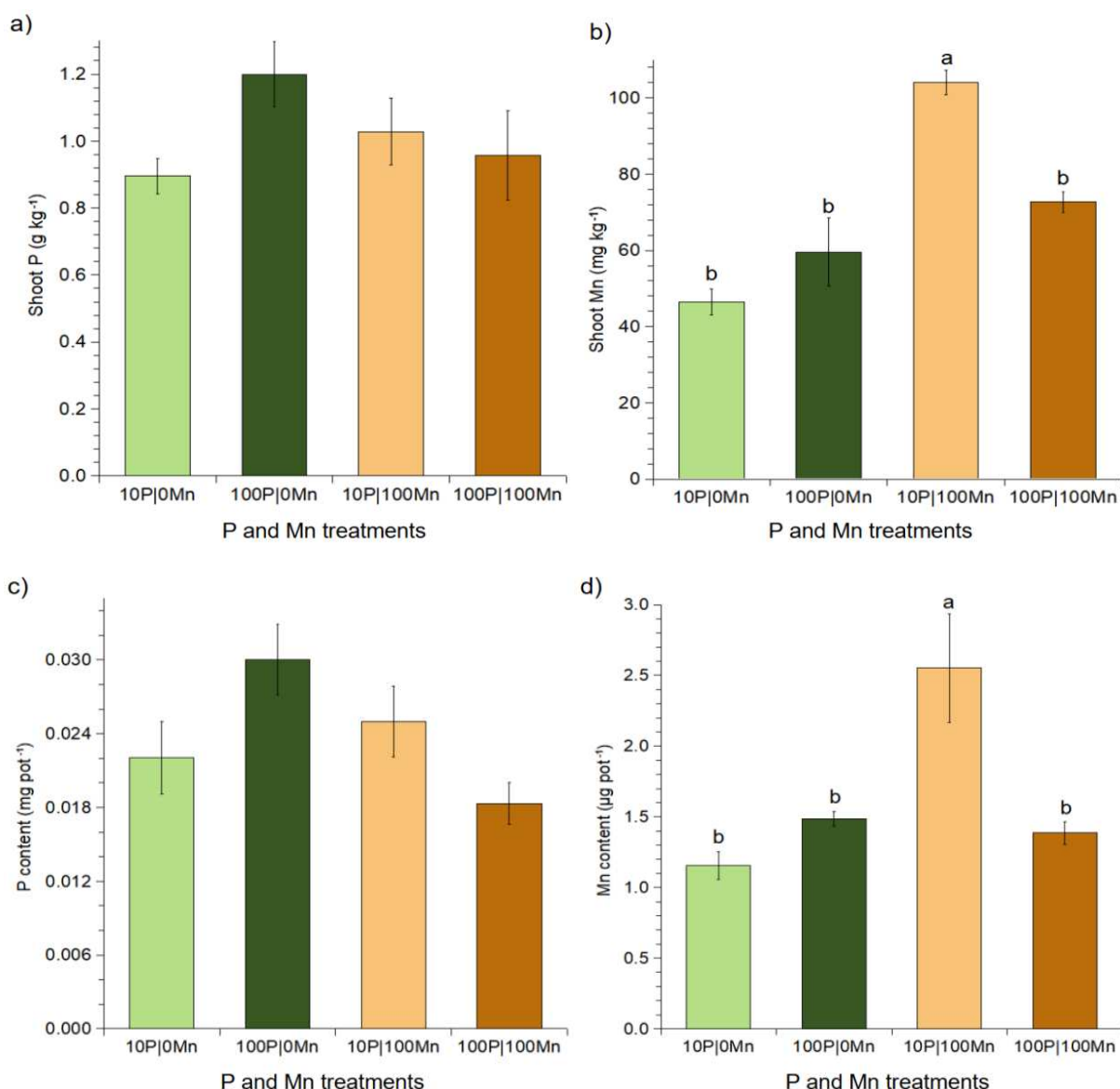


Figura 3.4 Teores de P e Mn na parte aérea vegetal. Concentração de P (a) e de Mn (b) na parte aérea, e conteúdo de P (c) e de Mn (d) na parte aérea de plantas de *Urochloa decumbens* inoculadas com *Rhizophagus irregularis* e irrigadas com soluções contendo combinações de 10 (10P) ou 100 (100P) µM de P e 0 (0Mn) ou 100 (100Mn) µM de Mn. Barras indicam erro padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de P e Mn pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

O conteúdo de P na parte aérea não foi influenciado significativamente pela disponibilidade de Mn e P na solução, sendo em média 0,02 mg vaso⁻¹ (Fig. 3.4 c). Em relação ao conteúdo de Mn na parte aérea, as plantas em 10P|100Mn apresentaram valor em torno de 55% maior em comparação ao observado em 10P|0Mn, com até 1,64 µg vaso⁻¹ (Fig. 3.4 d).

3.3.3 Análises de correlação de Pearson

A partir das análises de correlação, notamos que comprimento do MET apresentou correlação positiva e significativa com a área superficial das raízes, assim como com a frequência de colonização intrarradicular (Tabela 3.1). Além disso, e como esperado, o comprimento de raiz apresentou correlação positiva e significativa com a área superficial das raízes. A correlação negativa entre a concentração de Mn na parte aérea e a área superficial e o comprimento de raízes não foi significativa (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Matriz de correlação de Pearson entre parâmetros de biomassa vegetal e FMA e concentração de Mn e P foliar. Área superficial de raiz (AS) comprimento de raiz (CR), diâmetro médio de raiz (DR), comprimento do micélio externo total (MET), frequência de colonização por FMA (FC), concentração de Mn na parte aérea (Mn PA) concentração de P na parte aérea (P PA). Os asteriscos “*” e “**” indicam correlação significativa com $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente

	AS	CR	DR	MET	FC	Mn PA	P PA
AS	1	0,94*	0,30	0,64*	0,74**	-0,44	0,18
CR		1	0,09	0,51	0,65*	-0,53	0,15
DR			1	0,54	0,52	0,58	0,22
MET				1	0,70**	-0,01	0,20
FC					1	-0,24	0,05
Mn PA						1	0,13
P PA							1

3.3.4 Composição química de hifas extrarradiculares por μ -FTIR

Os principais picos presentes nos espectros médios de cada tratamento foram listados, bem como os possíveis modos vibracionais para cada faixa de número de onda. Dessa forma, foi possível identificar a presença dos compostos de interesse biológico por meio de suas interações intramoleculares, que vibram em faixas de número de onda específicas de cada região do espectro eletromagnético (Tabela 3.2). Então os espectros médios de cada tratamento foram plotados em um mesmo gráfico e as bandas correspondentes a compostos de interesse biológico foram evidenciadas (Fig. 3.5 a-b). A faixa de número de onda entre 3050 e 2800 cm^{-1} é utilizada como uma das principais referências para a presença de lipídios em amostras biológicas devido às vibrações dos grupos CH, CH_2 e CH_3 das cadeias de hidrocarbonetos dos lipídios ($3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$) e pela

vibração do grupo $=C-H$ ($3030-3010\text{ cm}^{-1}$), que caracteriza insaturações nas moléculas de lipídios (Movasaghi et al., 2008; Shapaval et al., 2023).

Em todos os espectros de hifas extrarradiculares, independentemente do tratamento, foi observada a presença de picos na região de 2900 cm^{-1} . Em 10P|0Mn, as hifas extrarradiculares apresentaram o pico de maior intensidade, enquanto as hifas extrarradiculares em 10P|100Mn o de menor intensidade (Fig. 3.5 a-b). Foi possível identificar a presença de um pico na região do 3030 cm^{-1} no espectro médio das hifas extrarradiculares de 10P|0Mn, mas não nos espectros das hifas dos demais tratamentos (Fig. 3.5 b).

Na região das amidas, que cobre a faixa de 1700 a 1500 cm^{-1} , notou-se a presença de dois picos em todos os tratamentos, os quais são característicos de vibrações presentes em estruturas secundárias de proteínas, sendo o pico em 1650 cm^{-1} denominado Amida I e o pico em 1550 cm^{-1} , Amida II (Fig. 3.5 b). A intensidade de absorbância variou entre os tratamentos nos dois picos de amidas. Enquanto nos tratamentos 10P|0Mn e 10P|100Mn pode-se notar a presença de ambos os picos em maior intensidade, nos tratamentos 100P|0Mn e 100P|100Mn foi observado a formação de um pico de maior intensidade na região da Amida I e outro, de menor intensidade, na região da Amida II (Fig. 3.5 b).

Entre os números de onda 1500 e 1200 cm^{-1} é possível encontrar uma ampla variedade de modos vibracionais que caracterizam moléculas de diferentes classes (Movasaghi et al., 2008; Skotti et al., 2014; Singla et al., 2021; Shapaval et al., 2023). Na região do 1430 cm^{-1} , o tratamento 10P|0Mn apresenta um pico de maior intensidade em comparação aos demais, sendo que essa região é caracterizada por vibrações de grupos $C-H$, $N-H$, $C-N$ COO^- e CH_2 e que podem estar presentes em lipídios e polissacarídeos, inclusive na estrutura do anel de piranose, comum em carboidratos como glicose, frutose, amido e glucanos (Movasaghi et al., 2008; Poletto et al., 2013; Li et al., 2023).

Já na região entre $1400-1300\text{ cm}^{-1}$ destacam-se dois principais picos, nos quais é possível caracterizar vibrações presentes em lipídios, proteínas e polissacarídeos (Movasaghi et al., 2008). A formação de um ombro na região do 1375 cm^{-1} pode sinalizar as vibrações de grupos como CH_2 , $C-C$, $C-O$, $C-H$ e $N-H$ presentes na estrutura da quitina fúngica (Shapaval et al., 2023). Os espectros de hifas extrarradiculares dos quatro tratamentos apresentaram a formação de um ombro na região da quitina, sendo a menor intensidade visualizada em 10P|100Mn. Na banda de fosfato, $1280-1210\text{ cm}^{-1}$, os espectros dos quatro tratamentos apresentaram a formação de um ombro na região do 1240 cm^{-1} , sendo que no tratamento 100P|0Mn foi observada a menor intensidade.

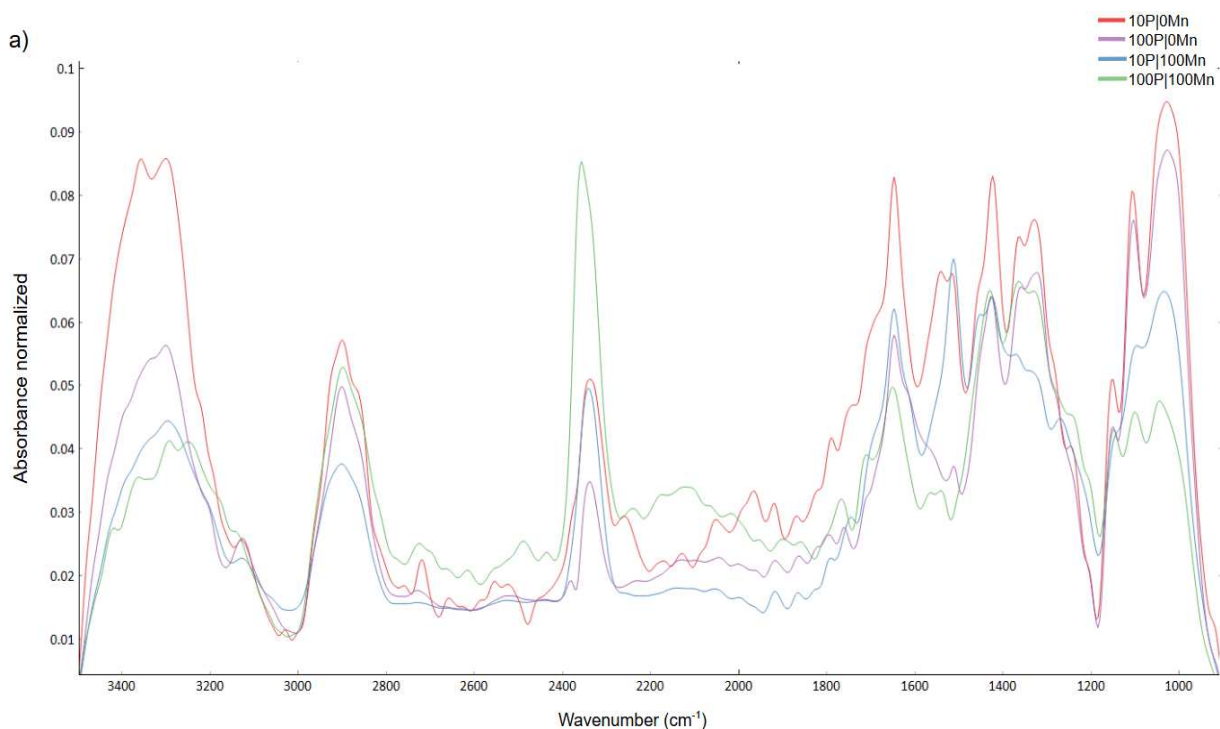
Tabela 3.2 Principais picos observados nas hifas extrarradiculares (HE) dos FMA sob estresse. Modos vibracionais: ν , alongamento, ν_s , alongamento simétrico, ν_{as} , alongamento assimétrico, δ , flexão e, ω , oscilação.

Principais picos das HE	Número de onda (cm^{-1})	Modos vibracionais	Compostos relacionados
1020–1040	1020–1050	$\nu\text{C-O-C}$, $\nu\text{C-O}$, $\delta\text{C-O}$ dos grupos C-OH	Carboidratos, incluindo glicose e glicogênio
1100–1105	1095–1105	$\nu_{as}\text{C-O-C}$, $\nu_s\text{PO}$ e $\nu_s\text{P-O-C}$	Polissacarídeos e compostos fosfatados, incluindo ácidos nucleicos (RNA e DNA)
1145–1150	1145	$\nu\text{C-O}$ e νPO	Oligossacarídeos e compostos fosfatados, incluindo polyP
1240–1270	1210–1280	$\nu_{as}\text{PO}^{2-}$ e $\nu_s\text{PO}$	Banda de fosfato (polyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana)
1320–1330	1330–1335	δCH_2 , ωCH	Lipídios, proteínas e polissacarídeos
1360–1380	1375	δCH_2 , $\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-O}$ e deformação de C-H e N-H	Quitina fúngica
1420–1430	1410–1445	Deformação de C-H e N-H, $\nu\text{C-N}$, $\nu_s\text{COO}^-$ e δCH_2	Lipídios e polissacarídeos, incluindo anel de piranose (glicose e glucanos relacionados)
1510–1550	1600–1500	$\delta\text{N-H}$ e $\nu\text{C-N}$	Amida II (proteínas)
1645–1650	1600–1700	$\nu\text{C=O}$, $\nu\text{C-N}$ e $\delta\text{N-H}$	Amida I (proteínas, especialmente transmembrana)
2895–2900	2800–3000	$\nu_{as}\text{CH}$, $\nu_{as}\text{CH}_2$ e $\nu_{as}\text{CH}_3$	Lipídios
3030	3010–3030	$\nu=\text{CH}$	Lipídios insaturados
3300	3100–3500	$\nu\text{O-H}$, $\nu\text{C-H}$ (anel) e $\nu_s\text{N-H}$	Água (principalmente), carboidratos, proteínas

Na região dos carboidratos, $1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$, foi observado nos espectros médios de das hifas extrarradiculares de todos os tratamentos, a formação de três picos que se

diferenciam em intensidade, mas não em posição. A formação de picos nas posições 1145, 1100 e 1040 cm^{-1} pode ser consequência de vibrações dos grupos C-O-C, C-O, C-OH, PO e P-O-C, que estão presentes em polissacarídeos, oligossacarídeos, monossacarídeos e em compostos fosfatados, como ácidos nucleicos, fosfolipídios ou polyP (Movasaghi et al., 2008; Poletto et al., 2013; Li et al., 2023; Shapaval et al., 2023). As hifas dos tratamentos 10P|0Mn e 100P|0Mn apresentaram elevada intensidade de absorbância na banda de carboidratos, especialmente na faixa do 1040 cm^{-1} , que é marcada pela presença de glicose e amido, e na faixa de 1100 cm^{-1} , no qual também podem ser identificados compostos como polissacarídeos e ácidos nucleicos.

Para a obtenção dos mapas de imagens hiperespectrais pelo detector FPA, foram selecionadas faixas de número de onda, na qual os compostos de interesse estariam presentes, sendo: região dos lipídios (3050 a 2800 cm^{-1}), região das proteínas (1700 a 1500 cm^{-1}), região da quitina (1390 a 1340 cm^{-1}), região do polyP (1280 a 1210 cm^{-1}) e região dos carboidratos (1200 a 950 cm^{-1}) (Fig. 3.6). Para as hifas dos tratamentos 10P|0Mn e 100P|0Mn foi possível identificar um padrão similar de localização dos compostos (Fig. 3.6). A distribuição de lipídios parece ocupar toda a área analisada das hifas, contudo, em intensidades distintas, sendo que nas regiões laterais da hifa parece haver maior intensidade da região de lipídios (Fig. 3.6). As proteínas se concentram em sua maior parte nas laterais, como se estivessem posicionadas em canais dispostos nos limites longitudinais das hifas (Fig. 3.6).



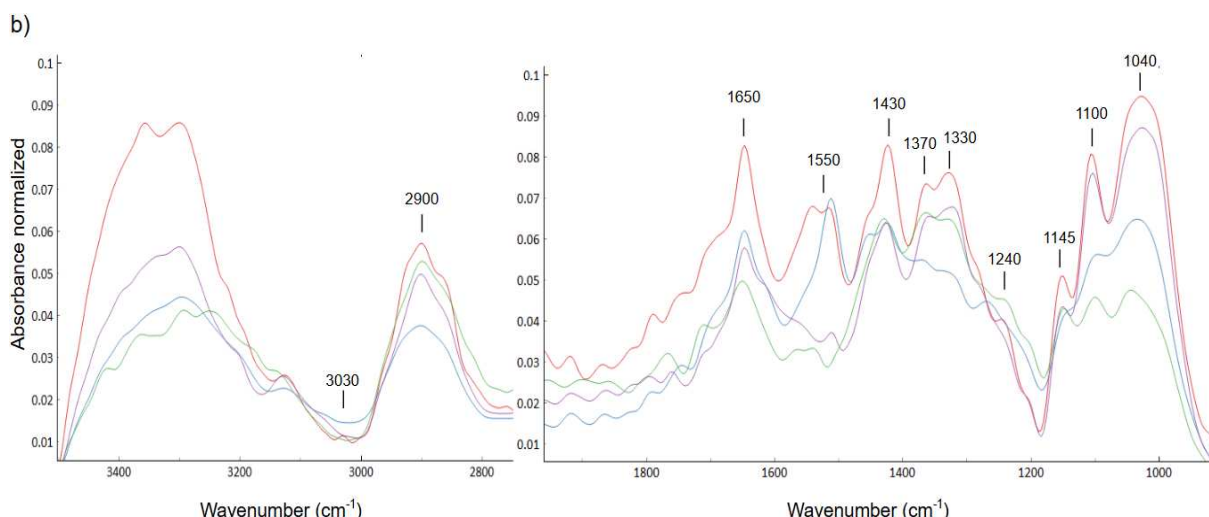


Figura 3.5 Espectros médios das hifas extrarradiculares. Espectros completos (a), e regiões de interesse composicional com marcação dos principais picos (b). Foram utilizadas as cores vermelho para o tratamento 10P|0Mn, roxo para 100P|0Mn, azul para 10P|100Mn e verde para 100P|100Mn.

Já a quitina está presente em toda a área analisada das hifas, ocupando pontos de maior e menor intensidade na hifa do tratamento 10P|0Mn e com distribuição mais uniforme na hifa do tratamento 100P|0Mn (Fig. 3.6). Nas hifas desses dois tratamentos a distribuição de polyP parece se difundir pela hifa, contudo ela se concentra nas extremidades superiores da imagem, para o tratamento 10P|0Mn, e em canais posicionados nos limites longitudinais da hifa, para o tratamento 100P|0Mn (Fig. 3.6). Os carboidratos, diferentes dos outros compostos, se distribuem de maneira praticamente uniforme ao longo das hifas, sem que ocorram regiões de espaços vazios ou mesmo com maior intensidade em relação ao seu entorno (Fig. 3.6).

Para a hifa em 10P|100Mn, a localização dos compostos se concentrou no canto direito superior da imagem, próximo ao limite da hifa (Fig. 3.6). Entretanto é possível perceber que mesmo com essa região de maior concentração de material, houve variação na forma de distribuição entre os compostos (Fig. 3.6). Para os lipídios é possível notar sua presença ao longo da hifa, com pontos de maior intensidade na porção inferior da imagem, no centro da hifa (Fig. 3.6). As amidas parecem se distribuir em feixes longitudinais ao longo da hifa e o polyP, mesmo que presente ao longo de todo o comprimento analisado, possui regiões de maior intensidade na posição longitudinal, como as proteínas (Fig. 3.6). A quitina possui distribuição similar à do polyP, contudo parece se posicionar de maneira mais difusa (Fig. 3.6). Os carboidratos, por sua vez, não se agrupam em pontos específicos ou em feixes, e sim ao longo de todo o comprimento analisado com intensidade alta e uniforme em comparação aos outros compostos (Fig. 3.6).

Quanto às hifas do tratamento 100P|100Mn, a localização dos compostos, de uma maneira geral, pareceu difusa e sem regiões em que foi possível determinar um padrão

de distribuição de cada composto (Fig. 3.6). Para lipídios há formação de uma área, na extremidade superior esquerda da imagem, em que parece haver maior concentração, sendo que sua distribuição se concentra, em termos gerais, no centro da hifa (Fig. 3.6). As proteínas seguem uma distribuição mais ampla e difusa, contudo é possível notar centralmente na hifa uma região de menor intensidade (Fig. 3.6). O mesmo não ocorre para quitina, polyP e carboidratos, que ocupam toda a área analisada da hifa de maneira ampla e uniforme (Fig. 3.6).

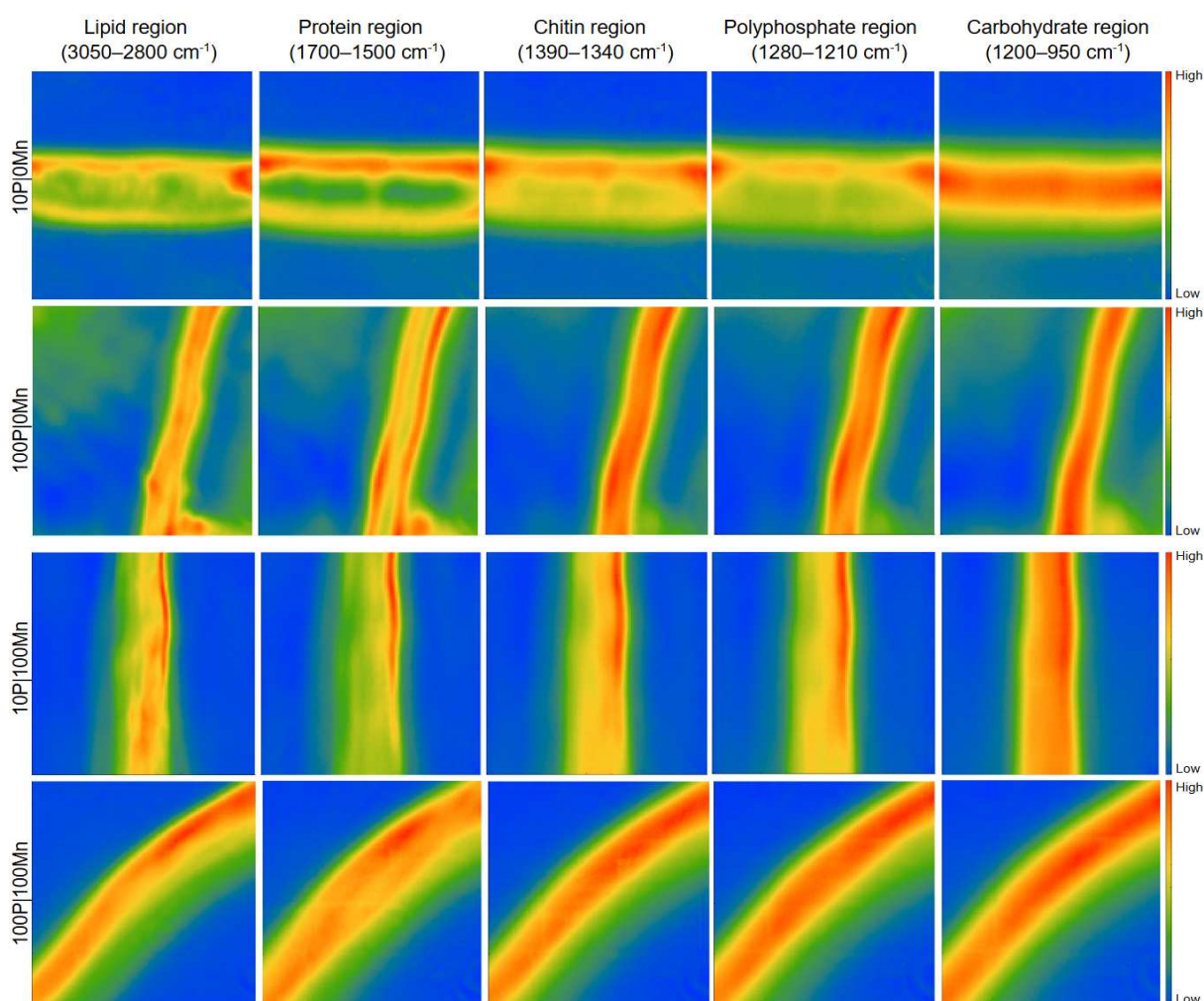


Figura 3.6 Mapas hiperespectrais gerados no modo FPA-FTIR. Hifas extrarradiculares do FMA *Rhizophagus irregularis* associado à *Urochloa decumbens* e recebendo solução nutritiva com diferentes concentrações de P e Mn, sendo 10 ou 100 μM de P e 0 ou 100 μM de Mn (10P|0Mn, 100P|0Mn, 10P|100Mn, 100P|100Mn). Barras com denominações “high” e “low” indicam a escala de intensidades de absorvância nos mapas hiperespectrais, sendo alta intensidade, “high”, em vermelho e baixa, “low”, em azul.

Para a análise dos dados de intensidades de absorvância, foram determinadas as áreas sob as curvas, ou integrais, das cinco regiões contendo informações dos grupos dos compostos químicos de interesse. As regiões selecionadas foram de 3050 a 2800 cm^{-1} ,

para lipídios, 1700 a 1500 cm^{-1} , para proteínas, 1380 a 1340 cm^{-1} , para quitina, 1280 a 1210 cm^{-1} , para polyP, e 1200 a 950 cm^{-1} para carboidratos (Fig. 3.7 a-d). Após a determinação das integrais e com base na metodologia utilizada por Skotti et al., (2014), foram calculadas as taxas de lipídios/proteínas, lipídios/carboidratos, quitina/carboidratos e polyP/carboidratos para cada tratamento. Esses valores foram correlacionados com a biomassa de FMA utilizando os dados de comprimento do micélio externo total e frequência de colonização intrarradicar (Tabela 3.3).

Observando os coeficientes de correlação de Pearson, nota-se que para ambas as variáveis relacionadas com a biomassa do FMA, a correlação com as razões entre as bandas de FTIR foi negativa (Tabela 3.3). Ao analisar as correlações com maior grau de significância estatística, é possível destacar a razão entre lipídios e carboidratos, que apresentou correlação negativa com o comprimento do micélio externo, bem como a razão entre quitina e carboidratos.

A frequência de colonização intrarradicar, teve correlação negativa significativa com a razão entre lipídios e carboidratos e com a razão entre polyP e carboidratos. Dessa maneira, o aumento da biomassa do FMA é inversamente proporcional à razão de lipídios por carboidratos. Enfatizando apenas o comprimento do MET, é possível observar que a razão de quitina por carboidratos é inversamente proporcional ao seu crescimento. Já para a frequência de colonização intrarradicar, a razão de polyP por carboidratos é inversamente proporcional ao seu aumento.

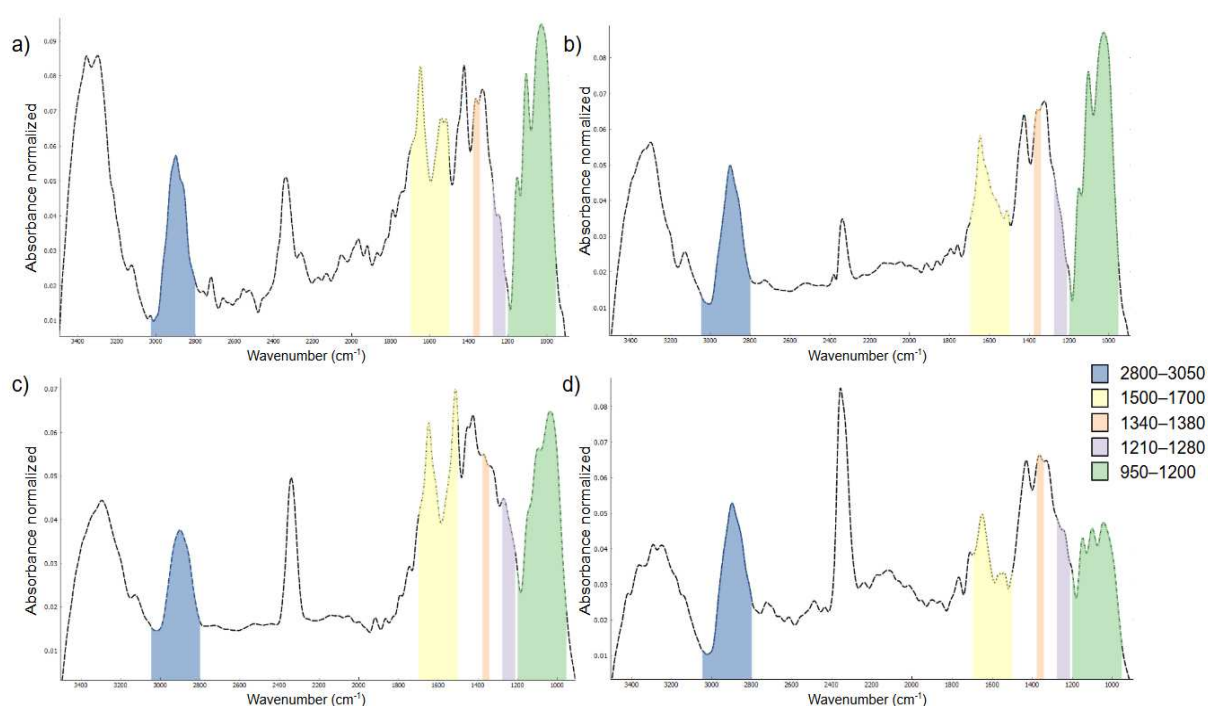


Figura 3.7 Bandas selecionadas nos espectros FTIR. Espectros de hifas extrarradiculares de

Rhizophagus irregularis, no qual são mostradas as integrais das regiões selecionadas para as bandas 3050–2800 cm⁻¹ para lipídios, 1700–1500 cm⁻¹ para proteínas, 1380–1340 cm⁻¹ para quitina, 1280–1210 cm⁻¹ para polyP, e 1200–950 cm⁻¹ para carboidratos. Sendo: a) 10P|0Mn, b) 100P|0Mn, c) 10P|100Mn e, d) 100P|100Mn.

Tabela 3.3 Matriz de correlação de Pearson entre composição química e parâmetros de biomassa do FMA. Lipídios/Proteínas, Lipídios/Carboidratos, Quitina/Carboidratos e PolyP/Carboidratos e as variáveis de biomassa do FMA comprimento do micélio externo total e a frequência de colonização intrarradicular. Os asteriscos “*” e “***” indicam significância de $p < 0,06$ e $p \leq 0,05$, respectivamente

	Micélio externo total	Colonização intrarradicular
Lipídios/Proteínas	-0,905	-0,840
Lipídios/Carboidratos	-0,985**	-0,982*
Quitina/Carboidratos	-0,997**	-0,956
PolyP/Carboidratos	-0,872	-0,980*

3.4 Discussão

3.4.1 Influência das disponibilidades de Mn e P no crescimento intra e extrarradicular do FMA

A exposição direta ao Mn pode causar toxicidade aos FMAs, diminuindo a colonização intrarradicular e a quantidade de hifas extrarradiculares (Clark e Zeto 2000, Malcova et al., 2002, Nogueira et al., 2004). Por outro lado, a alta disponibilidade de P pode inibir o estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular, reduzindo a presença do FMA no interior das raízes e consequentemente o crescimento de hifas extrarradiculares (Breuillin et al., 2010; Balzergue et al., 2011; Paries e Gutjahr 2023). Neste estudo, a extensão do micélio externo e a colonização intrarradicular de *R. irregularis* foram reduzidas quando expostas a maior concentração de Mn, mas apenas na maior concentração de P utilizada (100P|100Mn). Nessas condições, a colonização intrarradicular foi reduzida em 50% em relação aos outros tratamentos. Contudo, essa redução não foi estatisticamente significativa, possivelmente devido à variabilidade entre as repetições. Entretanto, a exposição a concentrações de Mn de 100 µM, em conjunto com a maior disponibilidade de P (100 µM de P) pode explicar a diminuição em parâmetros relacionados à produção de biomassa e o vigor do FMA.

A redução do comprimento do micélio externo e da quantidade de ácidos graxos 16:1ω5, que são marcadores da presença de FMAs no solo, foi observada em amostras de solos com histórico longo de fertilização mineral contendo P (Gryndler et al., 2006). A

aplicação de 0,5 mM de fosfato também foi capaz reduzir o estabelecimento de FMA no interior de raízes de arroz, sendo constatada a redução da densidade de arbúsculos e a indução de ramificações aberrantes nas hifas do micélio intrarradicular (Kobae et al., 2016). Concentrações elevadas de P inorgânico na planta podem levar à inibição da colonização intrarradicular por FMAs por meio de mecanismos de sinalização da planta que envolvem componentes da PSR (*Phosphate Starvation Response*), como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes relevantes para o estabelecimento da simbiose e a formação de arbúsculos (Das e Gutjahr, 2022). Em condições de suficiência de P, as raízes da planta hospedeira também reduzem a exsudação de moléculas sinalizadoras para a promoção da colonização por FMAs, como uma forma de prevenir os custos não necessários, em termos de carboidratos, para manutenção da associação micorrízico arbuscular na raiz (Venegas et al., 2021; Fossalunga e Novero, 2019).

O fato de o comprimento de MET ser semelhante entre o tratamento 10P|100Mn e àqueles sem adição de Mn, sugere que apenas a concentração de Mn a 100 μ M não causou redução das hifas extrarradiculares. Da mesma forma, a maior concentração de P utilizada no tratamento 100P|0Mn, 100 μ M de P, não reduziu o comprimento do micélio extrarradicular. Apenas a combinação de 100 μ M de Mn e 100 μ M de P causou a redução do comprimento do micélio externo. Estudos anteriores também mostraram correlação negativa entre a quantidade de micélio externo de FMAs, em associação com plantas de soja, e a concentração de Mn (Nogueira e Cardoso 2002).

A simbiose planta-FMA pode aliviar os efeitos deletérios que o excesso de Mn no solo causa à planta, uma vez que os FMAs podem reduzir a translocação do elemento para seu parceiro simbiote, por meio da modulação da expressão de genes de transportadores de Mn na raiz (De Oliveira et al., 2023). A presença do FMA também causa alteração das comunidades de microrganismos oxidantes e redutores de Mn, que podem atuar na diminuição da disponibilidade do Mn a ser absorvido pela planta (Nogueira et al., 2007). Os FMAs possuem a capacidade de imobilizar metais presentes no solo pela ação de substâncias secretadas pelas hifas, como a glomalina, ou nas paredes celulares das hifas e de glomerosporos (Ferrol et al., 2016). A glomalina é um composto complexo de glicoproteínas exsudada pelos FMAs, ela possui um importante papel na imobilização de metais no solo, se ligando principalmente ao Cu, mas também a outros elementos como o Mn (Chern et al., 2007; Ferrol et al., 2009; Ferrol et al., 2016).

Componentes da parede como a quitina também podem reduzir a disponibilidade de Mn e outros metais (Gow et al., 2016; Priyadarshini et al., 2021). Esses fungos podem ainda armazenar alguns elementos em seus vacúolos, compartimentalizando estes íons e evitando efeitos nocivos no citoplasma (González-Guerrero et al., 2008; Ferrol

et al., 2009; Ferrol et al., 2016). No citosol de hifas de FMA, há a presença de metalotioneínas e glutathione, ambas moléculas quelantes de metais, além disso suas membranas possuem diferentes tipos de transportadores de efluxo de metais pesados (Ferrol et al., 2009). Dessa forma, os FMAs possuem grande capacidade de manter a homeostase em condições de estresse por metais pesados.

Há numerosos relatos na literatura sobre o papel dos FMAs no aumento da tolerância ao estresse por metais pesados em plantas, sendo um dos mecanismos, a imobilização de metais nas estruturas fúngicas (González-Guerrero et al., 2008; Ferrol et al., 2009; Lehmann e Rillig, 2015; Begum et al., 2019; Riaz et al., 2021). Esses mecanismos corroboram com a observação frequente do aumento de tolerância e mitigação de efeitos negativos de plantas micorrizadas a metais pesados (Hildebrandt et al., 2007; Schneider et al., 2016; Ferrol et al., 2016). Dessa forma, neste estudo inferimos que em menores concentrações de P, exposição ao Mn na concentração de 100 μ M não foi deletéria ao estabelecimento intra e extrarradicular do FMA. No entanto, houve efeito sinérgico do tratamento 100P|100Mn, reduziu a extensão de micélio intra e extrarradicular do FMA.

3.4.2 Acúmulo de Mn na parte aérea e aumento do diâmetro médio das raízes

As plantas do tratamento 10P|100Mn apresentaram maior concentração de Mn na parte aérea, assim como o maior diâmetro médio das raízes quando comparadas às plantas dos demais tratamentos. O aumento do diâmetro de raízes expostas a altas concentrações de Mn em videiras foi associado à oxidação de auxinas ou à formação de uma camada de células mortas ao redor das raízes como mecanismo para impedir a entrada de Mn (Fecht-Christoffers et al., 2007; Mou et al., 2011). A baixa disponibilidade de P também pode aumentar a espessura de raízes, tendo essa resposta sido observada em plantas micorrizadas ou não (Berta et al., 1993; Wu et al., 2017).

No fungo *Saccharomyces cerevisiae* o gene *PHO84* codifica um transportador de P inorgânico de alta afinidade envolvido também no transporte de baixa afinidade de íons Mn^{2+} (Jensen et al., 2003). A deleção ou superexpressão do gene *PHO84* causa alterações nas concentrações intracelulares de Mn, sugerindo que esse transportador poderia facilitar a entrada de Mn nas células do fungo (Jensen et al., 2003). Dessa forma, leveduras cultivadas sob alta concentração de P tiveram redução da absorção de Mn, corroborando com a hipótese da função dupla do transportador PHO84 em *S. cerevisiae* (Jensen et al., 2003). Portanto, a homeostase de Mn pode estar intimamente ligada ao metabolismo de P (Jensen et al., 2003; Robinson et al., 2021). Então, é possível que o

tratamento 10P|100Mn, pode ter favorecido a absorção de Mn pelas hifas fúngicas, resultando no seu acúmulo na parte aérea das plantas.

3.4.3 Análise composicional das hifas extrarradiculares por μ -FTIR

Ao avaliar a composição química das hifas de FMA, notamos que apesar das diferenças em intensidades em algumas regiões características, as hifas dos diferentes tratamentos apresentaram espectros bastante semelhantes. Com isso, foi possível caracterizar as hifas extrarradiculares de *R. intraradices* a partir de seus espectros de μ -FTIR. Este tipo de técnica vem sendo realizado em hifas de outros fungos filamentosos como ferramenta de identificação baseando-se em características únicas de seus espectros (Shapaval et al., 2013; Lecellier et al., 2014; Barboux et al., 2021). Se por um lado foi possível encontrar padrões comuns entre os espectros referentes aos quatro tratamentos, também pode-se diferenciar as hifas a partir de suas variações. Tais variações incluíram deslocamentos das curvas em relação ao número de onda e à intensidade de absorbância dos picos em algumas regiões do espectro.

É interessante ressaltar a presença do pico na região do 3030 cm^{-1} apenas no espectro médio de hifas do tratamento 10P|0Mn, e que este está relacionado à insaturações nas cadeias lipídicas (Movasaghi et al., 2008). A maior quantidade de insaturações nas cadeias pode indicar uma síntese ativa de TAG com ácidos graxos insaturados (Shapaval et al., 2023). Em geral, os FMA investem no armazenamento de ácidos graxos no micélio extrarradicular, sendo a quantidade dependente de fatores relacionados ao hospedeiro vegetal, já que os FMA são auxotróficos para este tipo de composto, e também às condições ambientais (Keymer e Gutjahr, 2018; Wipf et al., 2019; Kameoka e Gutjahr, 2022).

Os lipídios nas hifas extrarradiculares podem ser metabolizados e utilizados para o crescimento do fungo, corroborando com sua função de forrageamento do solo em busca de nutrientes, o que é fundamental para a manutenção da simbiose (Bago et al., 2002). Dessa forma, as hifas do tratamento 10P|0Mn poderiam estar em uma condição de menor estresse do que as demais, uma vez que a baixa concentração de P do ambiente as mantêm em uma relação de maior dependência da planta hospedeira pelo FMA, que forneceria assim mais carboidrato e lipídios ao fungo (Lenoir et al., 2016; Wipf et al., 2019; Feng et al., 2020). Além disso, as hifas em 10P|0Mn não foram submetidas a altas concentrações de Mn, permitindo assim o acúmulo de lipídios de melhor qualidade (Wipf et al., 2019; Feng et al., 2020).

Por outro lado, situações de estresse ambiental podem influenciar na biossíntese e no transporte de lipídios dentro das hifas, pois além de atuarem como moléculas de reserva energética, eles participam da sinalização e da modulação da resposta do fungo à estresses (Feng et al., 2020). Mudanças na composição e peroxidação lipídica das membranas podem alterar a permeabilidade e a fluidez das membranas celulares, o que pode ser crucial para a proteção contra estresses ambientais (Feng et al., 2020). É interessante ressaltar que a razão entre lipídios e carboidratos se correlacionou negativamente com a extensão do micélio externo. O espectro médio referente às hifas do tratamento 100P|100Mn apresentou elevada intensidade do pico 2900 cm^{-1} , que está associado ao comprimento das cadeias lipídicas. Além disso, as imagens hiperespectrais obtidas pelo modo FPA-FTIR mostram que o conteúdo lipídico da hifa em 100P|100Mn pareceu mais homogeneamente distribuído e mais difuso em relação ao observado nas hifas dos demais tratamentos.

Hifas de FMAs expostas a ambientes poluídos por Cu apresentaram danos estruturais, incluindo a diminuição do crescimento do micélio externo e a redução da produção de glomerosporos (Ferrol et al., 2009). Além disso, uma das estratégias do FMA para evitar a toxicidade do Cu no citoplasma das hifas é seu o sequestro e armazenamento nos vacúolos celulares, bem como a produção de metalotioneínas, que são proteínas que se ligam a metais e os impedem de se associarem à outras biomoléculas (Ferrol et al., 2009).

Nos espectros médios das hifas sob os tratamentos de altas concentrações de Mn, os picos referentes à região de carboidratos se apresentaram menos intensos em relação ao observado nos espectros dos tratamentos com ausência de Mn. Por outro lado, os padrões de distribuição de carboidratos analisados nas imagens hiperespectrais foram semelhantes para todos os tratamentos. Foi observado que as hifas extrarradiculares dos quatro tratamentos apresentaram disposição homogênea de carboidratos, sendo possível que a região analisada, entre 1200 e 950 cm^{-1} , incluía majoritariamente os componentes de suas paredes celulares, como quitina e β -1,3-glucanos, uma vez tais compostos pertencem ao grupo dos carboidratos (Bowman e Free, 2006).

O aumento da concentração de P no ambiente pode alterar o fluxo de carboidratos da planta para o FMA, já que a maior disponibilidade desse nutriente induz a sua absorção pela via direta através das raízes, tornando o hospedeiro vegetal menos dependente do FMA, o que pode inclusive ocasionar na diminuição da extensão da colonização intrarradicular (Konvalinková et al., 2017). Isso explicaria também a correlação negativa para a razão entre polyP e carboidratos e a extensão do micélio externo, já que

com maior concentração de P, as hifas poderiam ter recebido menor quantidade de carboidratos da planta.

3.5 Conclusão

Este estudo evidenciou que a exposição ao Mn a 100 μ M, combinada com a concentração de P também a 100 μ M, afetou significativamente o desenvolvimento e a composição química de hifas extrarradiculares de *R. irregularis* em associação com a planta hospedeira *U. decumbens*. Além disso, nos tratamentos com P a 10 μ M, o transporte de Mn foi favorecido para a parte aérea vegetal. Houve redução na extensão do comprimento total do micélio externo e na colonização intrarradicular, sugerindo sensibilidade do FMA a tal situação de estresse ambiental. A alteração na composição lipídica das hifas, como a elevação da intensidade de absorbância no do pico em 2900 cm^{-1} , que caracteriza a presença de cadeias lipídicas, pode indicar uma forma de adaptação bioquímica às condições adversas. Além disso, a disposição homogênea de carboidratos nas hifas reforça o papel estrutural predominante de componentes como quitina e β -1,3-glucanos nas paredes celulares. Tais achados contribuem para o entendimento dos impactos de estresses ambientais nos FMAs, ressaltando a importância de se levar em consideração, não apenas os fatores relacionados às respostas do parceiro vegetal durante a associação, mas também do fungo em si, uma vez que este é um assunto raramente abordado na literatura.

Capítulo 4. Efeitos do sombreamento na associação micorrízica arbuscular em *Urochloa decumbens* e análise composicional das hifas extrarradiculares por μ -FTIR

Effects of shading on arbuscular mycorrhizal association in *Urochloa decumbens* and compositional analysis of extraradical hyphae using μ -FTIR

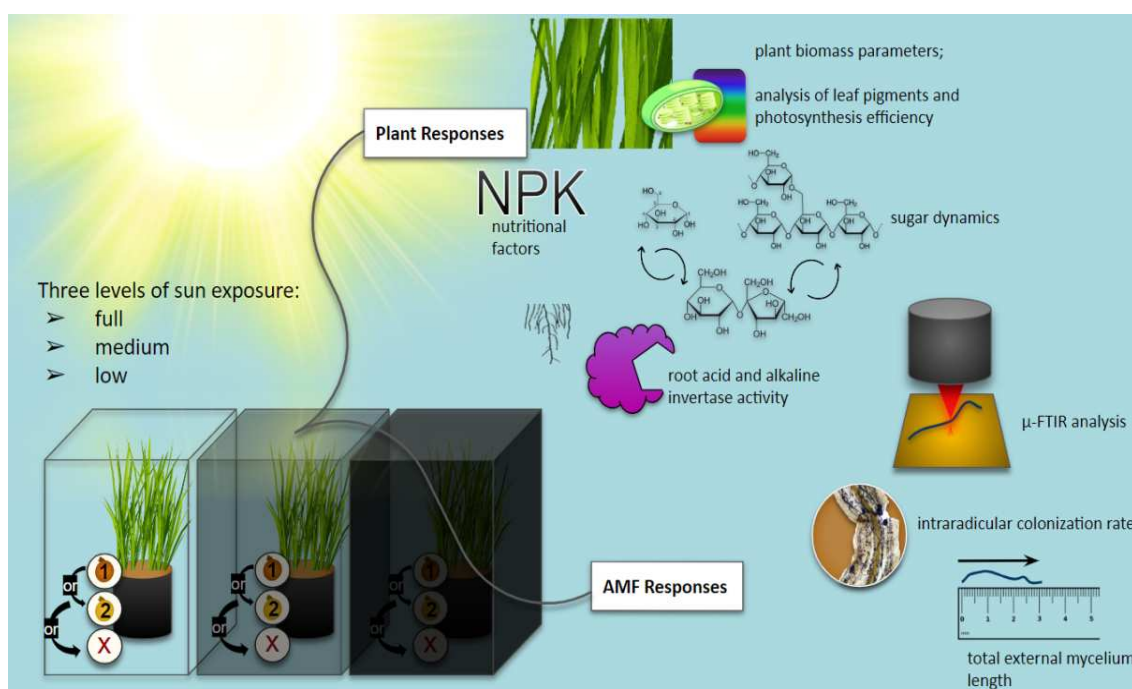


Figura 4.1 Resumo gráfico do capítulo. Plantas de *Urochloa decumbens* inoculadas ou não (X) por dois isolados de FMA (1 e 2), foram submetidas a três condições de luminosidade, plena, média e baixa, por 30 dias. Após esse período foram avaliados parâmetros como biomassa, nutrientes foliares, concentração de açúcares e atividade das enzimas invertases (INV) ácida e alcalina da planta. Também foi analisada a biomassa dos micélios intra e extrarradiculares do fungo micorrízico arbuscular (FMA), bem como variações em sua composição química, utilizando a técnica de microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR).

Resumo

A redução da intensidade luminosa promove alterações metabólicas em plantas, podendo afetar a simbiose com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Este estudo investigou os efeitos do sombreamento na relação planta-FMA em *Urochloa decumbens*, submetida a três condições de luminosidade (luz plena, média e baixa) e três estados de micorrização (colonizadas por *Rhizophagus irregularis* "DAOM197198", *Glomus intraradices* "IAC" ou não micorrizadas). Foram avaliadas as respostas da planta em relação à produção de biomassa vegetal, os índices de pigmentos foliares, índice de balanço de nitrogênio, parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, acúmulo de N, P e K na parte aérea, concentração de glicose, sacarose e amido em folhas e raízes e a atividade de invertases (INV) ácida e alcalina nas raízes, bem como sua concentração de proteínas solúveis totais. Também foram avaliadas

as alterações bioquímicas nas hifas extrarradiculares dos FMAs, como modificações na composição de lipídios, carboidratos, proteínas e outras moléculas, que foram analisadas pela técnica de microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (μ -FTIR). Além disso foram analisadas a colonização micorrízica das raízes e a extensão do micélio extrarradicular. Os resultados mostraram que plantas não micorrizadas apresentaram aumento do índice de clorofila foliar sob luz média e baixa. Além disso, a produção de biomassa vegetal diminuiu com o sombreamento, independentemente do status micorrízico. A presença de FMAs favoreceu a produção de perfilhos, e a absorção de P em todas as condições de luz. Sob luz baixa, os benefícios da micorrização na produção de biomassa foram reduzidos. Houve menor atividade da INV alcalina em raízes colonizadas por *G. intraradices* IAC sob luz baixa. Quanto aos FMAs, o sombreamento reduziu arbúsculos e vesículas, mas não afetou significativamente a frequência da colonização ou a extensão do micélio extrarradicular. Análises por μ -FTIR revelaram conformações espectrais distintas entre os isolados e alterações composicionais nas hifas, especialmente em lipídios e carboidratos.

Palavras-chave: estresse por sombreamento; simbiose micorrízica arbuscular; hifas extrarradiculares; alocação de carboidratos; análise por μ -FTIR.

Abstract

The reduction of light intensity promotes metabolic changes in plants, which may affect the symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). This study investigated the effects of shading on the plant-AMF relationship in *Urochloa decumbens*, subjected to three light conditions (full, medium and low light) and three mycorrhization states (colonized by *Rhizophagus irregularis* "DAOM197198", *Glomus intraradices* "IAC" or non-mycorrhized). Plant responses were evaluated, such as plant biomass, leaf pigment indices, nitrogen balance and photochemical parameters, nutrient accumulation in the shoot, glucose, sucrose and starch concentration in the plant and acid and alkaline invertase (INV) enzyme activity in the roots, as well as their total soluble protein concentration. Biochemical changes in the extraradical hyphae of AMF were also evaluated, such as modifications in the composition of lipids, carbohydrates, proteins and other molecules, which were analyzed by Fourier transform infrared microspectroscopy (μ -FTIR). In addition, the colonization of roots by intraradical mycelium and the extension of extraradical mycelium were analyzed. The results showed that non-mycorrhized plants presented an increase in leaf chlorophyll index under medium and low light. In addition, plant biomass decreased with shading, regardless of mycorrhizal status. The presence of AMF favored tiller production, and P absorption was

greater in mycorrhized plants under all light conditions. Under low light, the benefits of mycorrhization on biomass were reduced. There was lower alkaline INV activity in roots colonized by *G. intraradices* IAC under low light. Regarding AMF, shading reduced arbuscules and vesicles, but did not significantly affect the frequency of colonization or the extent of extraradical mycelium. μ -FTIR analyses revealed distinct spectral conformations among isolates and compositional changes in hyphae, especially in lipids and carbohydrates. Under low light, carbohydrates were concentrated in the central and apical regions of hyphae, while under other conditions they were more evenly distributed. The effects of shading on the plant-AMF relationship ranged from neutral to positive, highlighting differences in the performance of isolates, even if they possibly belonged to the same species.

Keywords: shade stress; arbuscular mycorrhizal symbiosis; extraradical hyphae; carbohydrate allocation; μ -FTIR analysis.

4.1 Introdução

A disponibilidade de carboidratos é um fator fundamental para a simbiose micorrízica arbuscular (MA), uma vez que o FMA depende exclusivamente do carbono fornecido pelo hospedeiro fotossintetizante para ser utilizado em seus processos fisiológicos (Hampp e Schaeffer, 1999; Bago et al., 2000; Wipf et al., 2019). A síntese e transporte de fotoassimilados requer o controle de respostas celulares que envolvem todo o organismo vegetal (Wipf et al., 2019). Em ocasiões de diminuição da qualidade ou da intensidade luminosa, alterações metabólicas podem ser causadas às plantas diretamente no processo da fotossíntese ou em uma série de respostas fisiológicas subsequentes (Konvalinková e Jansa, 2016). Por exemplo, plantas da espécie *Medicago truncatula* em condição de sombreamento, no qual a luz incidente foi reduzida em níveis superiores a 50% por um período de 38 dias, apresentaram redução da produção de biomassa vegetal e alteração intensa de sua arquitetura, o que demonstra o forte efeito da limitação de carbono (Konvalinková et al., 2015).

O estresse por diminuição da intensidade luminosa causa modificações na utilização e no transporte de fotoassimilados, sendo que no caso de plantas associadas à FMA o sombreamento também pode afetar a simbiose de maneiras complexas (Konvalinková e Jansa, 2016). Nas plantas, a intensidade da luz incidente irá influenciar na concentração e na composição geral de carboidratos presentes nos tecidos vegetais, que

podem variar entre diversas moléculas como, glicose, sacarose e amido, dentre outras (Nagaraj et al., 2001; Barros et al., 2020).

Os FMAs atuam como drenos de carbono nas raízes, alterando o metabolismo de carboidratos e podendo induzir a atividade das enzimas invertases (INV), que são cruciais para o fornecimento de hexoses ao fungo, já que catalisam a hidrólise da sacarose nas hexoses frutose e glicose (Bago et al., 2000; Gaude et al., 2012; Wipf et al., 2019). Em um estudo com videiras, por exemplo, a micorrização reduziu os níveis de sacarose nas folhas e favoreceu o seu aumento nas raízes e, além disso, também houve maior atividade de INV nas raízes, o que foi associado à maior demanda de carboidratos pelo FMA (Goddard et al., 2021).

Experimentos de sombreamento possibilitam o estudo da distribuição de carboidratos na planta hospedeira, bem como as possíveis respostas dos FMAs em tal condição de estresse (Konvalinková e Jansa, 2016; Konvalinková et al., 2015; Bitterlich et al., 2019; de la Hoz et al., 2021; Saha et al., 2022). Portanto, além das alterações fisiológicas envolvidas no processo de resposta ao estresse da planta, também é importante analisar os processos referentes ao FMA, uma vez que este é um assunto raramente relatado (Konvalinková et al., 2015).

Condições de sombreamento poderiam, por exemplo, levar as plantas a priorizarem a alocação de carboidratos para o crescimento de sua parte aérea em detrimento das raízes (Konvalinková e Jansa, 2016). Isso resultaria em menor quantidade de carboidratos sendo direcionados para os FMAs, o que poderia causar estresse ao fungo devido à limitação na disponibilidade de carboidratos e/ou outros compostos advindos da planta, que são fonte exclusiva de carbono para FMAs.

Valores baixos da razão entre luz vermelha e vermelho distante, levam as plantas a apresentarem uma série de sintomas que caracterizam a síndrome de evitação da sombra, que é induzida quando o fitocromo B está sob sombreamento (Gelderen, 2018; Saha et al., 2022). Nessa síndrome, as plantas induzem o crescimento e alongamento da parte aérea com a finalidade de capacitá-las para competir com plantas vizinhas pela luz disponível (Gelderen, 2018; Saha et al., 2022). Assim, quando a deficiência de luz se torna um fator limitante para o crescimento vegetal ocorre redução do fluxo de carboidrato para as raízes.

Por outro lado, a presença de FMA nas raízes em condições de sombreamento pode trazer benefícios às plantas, aumentando sua tolerância à falta de luz, fornecendo nutrientes, como P e N, água e contribuindo na resposta de evitação da sombra (Konvalinková e Jansa, 2016; de la Hoz et al., 2021; Saha et al., 2022). Contudo, também tem sido observada a ocorrência de efeitos negativos da relação MA no desenvolvimento da

planta hospedeira, podendo a relação, antes mutualista, acabar se tornando uma forma de parasitismo (Konvalinková et al., 2015; Konvalinková e Jansa, 2016; de la Hoz et al., 2021). Isso ocorre pois existe a possibilidade de a transferência do P via FMA ser regulada negativamente quando em condições de baixa luz devido à deficiência de carboidratos nas raízes (Konvalinková et al., 2015; de la Hoz et al., 2021).

Ainda existem dúvidas quanto ao momento em que os efeitos da simbiose com FMA passam a não beneficiar a planta hospedeira em uma situação de estresse por redução da luminosidade (Saha et al., 2022). Pode ser que as plantas continuem a manter bons níveis de colonização micorrízica como um mecanismo de investimento para o futuro, haja vista sua natureza sésil perante as condições ambientais que estão sempre em modificação (Konvalinková e Jansa, 2016). Também há possibilidade de as plantas não possuírem um controle tão refinado sobre a extensão da colonização micorrízica, sendo sua diminuição em casos de sombreamento apenas uma consequência direta da redução de fotoassimilados nas raízes (Konvalinková e Jansa, 2016).

Nesse contexto, este capítulo busca estudar o perfil composicional de hifas extrarradiculares de FMA em condições de sombreamento de seu hospedeiro fotossintetizante. Foi hipotetizado que a baixa intensidade luminosa, ao influenciar a capacidade fotossintética da planta, resultará em menor direcionamento de carboidratos para o FMA, causando alterações bioquímicas nas hifas extrarradiculares, como modificações na composição de lipídios, carboidratos, proteínas e outras moléculas. Por outro lado, também buscamos evidenciar as respostas das plantas micorrizadas à diferentes condições de sombreamento, e os possíveis efeitos da presença de FMA no aumento da tolerância das plantas à baixa intensidade luminosa. Procuramos compreender como tal situação influencia na absorção e acúmulo de nutrientes, bem como os processos relacionados ao metabolismo de carbono durante o período de sombreamento das plantas micorrizadas.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Delineamento experimental

Foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação em esquema fatorial 3 x 3, sendo três condições de luminosidade e três tratamentos de micorrização, com nove repetições. Os tratamentos de micorrização consistiram em plantas não inoculadas com FMA, (N), plantas inoculadas com *Rhizophagus irregularis* “DAOM197198” (D) e plantas inoculadas com *Glomus intraradices* “IAC” (G). As condições de luminosidade

consistiram em exposição plena à luz solar, luz plena (F), redução de 68% da luminosidade plena, luz média (M), e redução de 93% da luminosidade plena ao meio-dia, luz baixa (L). Os tratamentos se denominaram: N-F, D-F, G-F, N-M, D-M, G-M e N-L, D-L, G-L, respectivamente.

4.2.2 Materiais biológicos e condições de crescimento

A espécie vegetal utilizada neste experimento foi *Urochloa decumbens* enquanto os FMA foram os isolados *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 e *Glomus intraradices* IAC, que foi gentilmente cedido pela Dra. Adriana Parada Dias da Silveira da Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), São Paulo (SP). Os inóculos dos isolados de FMA utilizados durante o experimento foram obtidos a partir de vasos de multiplicação com *U. decumbens* como planta hospedeira. Para isso, por volta de 50 sementes de *U. decumbens*, previamente desinfetadas superficialmente (10 min, NaClO 2,5% e 0,1 mL de *TWEEN*® 20), foram cultivadas em vasos plásticos de 3000 mL, contendo uma mistura 1:1 de solo e areia esterilizados por autoclavagem (2 ciclos de 1 h a 120 °C, 1 atm em intervalo de 24 h).

As sementes foram inoculadas no momento do plantio com cerca de 100 mL de inóculo misto. As plantas foram irrigadas com água até o surgimento das primeiras inflorescências. Após este período a irrigação foi suspensa até que plantas e substrato estivessem completamente secos. Após secos, a parte aérea foi cortada e o substrato foi revolvido. As raízes foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm e misturadas ao substrato, que então foi utilizado como inóculo misto. Antes da utilização do inóculo foi realizada a contagem de clamidósporos pelo método Gerdemann e Nicolson (1963) e os inoculantes resultantes foram armazenados em câmara fria a 9 °C.

O experimento foi realizado sob condições de casa de vegetação entre os meses de março a maio de 2023 em Campinas, São Paulo (22°49'38"S 47°04'12.88"W). Cerca de 10 sementes de *U. decumbens* previamente desinfetadas superficialmente (10 min, NaClO 2,5% e 0,1 mL de *TWEEN*® 20) foram semeadas em vasos plásticos de 1000 mL preenchidos com areia lavada esterilizada em autoclave (2 ciclos de 1 h a 120 °C, 1 atm em intervalo de 24 h). Nos tratamentos com inoculação de FMA, as plantas foram inoculadas junto à semeadura. Para isso, foram adicionados cerca de 20 mL de inóculo misto (contendo fragmentos de raízes colonizadas, hifas e clamidósporos) por vaso, que possuíam em torno de 470 e 430 clamidósporos para *R. irregularis* DAOM197198 e *G. intraradices* IAC, respectivamente. Nos vasos de tratamentos não micorrizados não houve

adição de inóculo. Após a germinação foi realizado o desbaste e foram mantidas quatro plântulas por vaso.

A fim de equiparar a microbiota presente nos inóculos, foi coletado o filtrado dos inoculantes de FMA. Para o procedimento, 50 mL de cada inoculante, separadamente, foram acrescidos em um béquer com 1500 mL de água estéril. Após agitação seguida de repouso, a mistura foi peneirada em uma malha de 0,025 mm e filtrada por papel de filtração lenta e retenção nominal de 0,002 mm, sendo que partículas superiores a tal medida, como hifas fúngicas e clamidósporos, foram retidas pelo filtro. Então 10 mL de filtrado de cada inoculante, DAOM197198 e *Glomus intraradices* IAC, foram adicionados a cada vaso dos tratamentos não micorrizados (N). Nos tratamentos inoculados com DAOM197198, 20 mL de filtrado de *Glomus intraradices* IAC foram acrescidos e vice-versa para os tratamentos inoculados com *Glomus intraradices* IAC. As plantas foram irrigadas duas vezes por semana com 50 mL de solução nutritiva de Hoagland modificada com baixa concentração de P (100 µM) e com água estéril quando necessário. Nos primeiros 30 dias de experimento todas as plantas permaneceram sob a mesma condição de luminosidade plena, sendo posicionadas ao acaso e aleatorizadas na bancada uma vez por semana.

Para os tratamentos de redução de luminosidade foram instaladas coberturas de sombrite e a Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) foi medida ao meio-dia utilizando um fluorímetro portátil (FluorPen FP100, Photon Systems Instruments, Czech Republic). No tratamento de luz média a luminosidade se manteve $68 \pm 3\%$ abaixo da luz plena, enquanto no tratamento de luz baixa a luminosidade se manteve $93 \pm 3\%$ abaixo da luz plena. Dentro de cada tratamento de luz os vasos foram aleatorizados uma vez por semana.

As plantas foram submetidas aos tratamentos de luminosidade por 30 dias e nesse período foram medidos semanalmente os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* (FluorPen FP100, Photon Systems Instruments, Czech Republic) e os índices de clorofila, antocianinas e flavonóis, bem como o índice de balanço de nitrogênio (NBI [*Nitrogen Balance Index*]), razão entre os índices de clorofila e flavonóis (Dualox Scientific™ portable sensor, ForceA, France). Após os 30 dias sob os tratamentos de luz, completando 60 dias de experimento, a parte aérea, raízes e o substrato de cada vaso foram coletados.

4.2.3 Avaliação de parâmetros biométricos e determinação das concentrações de nutrientes

Antes da coleta, a altura da parte aérea foi medida com uma régua e o número total de perfilhos por vaso foi contado. Durante a coleta as raízes foram lavadas e cada porção experimental (parte aérea, raízes e substrato) foi armazenada separadamente. As partes aérea e as raízes de cinco repetições de cada tratamento foram armazenadas em

nitrogênio (N₂) líquido, enquanto para as outras quatro repetições, a parte aérea foi seca em estufa a 60 °C por sete dias e pesada para determinação da massa da matéria seca. As raízes foram lavadas, digitalizadas em scanner com resolução de 600 dpi (Epson Expression 12000XL, Epson America Inc., Long Beach, CA, USA) e as imagens analisadas com o software WinRhizo (Regent Instruments Inc., Montreal, QC, Canadá) para a determinação do comprimento total, área total e diâmetro médio ponderado do sistema radicular. Em seguida uma subamostra das raízes foi armazenada em etanol 50% para posterior análise da colonização micorrízica.

O restante das raízes foi seco em estufa a 60 °C por sete dias e pesado para a determinação da produção de biomassa de raiz. Para a determinação da massa foliar por área (LMA [*Leaf Mass per Area*]) foram utilizados seis discos de folhas secas com 6 mm de diâmetro e com área foliar total de 169,64 mm², os discos foram pesados e a LMA foi calculada a partir da razão entre a massa e a área (Witkowski e Lamont, 1991). Para a determinação da concentração de P e K, 0,5 g de matéria seca da parte aérea moída foi digerida em solução de HNO₃-HClO₄ (3:1 v/v), conforme Zasoski e Burau (1977) e a concentração de P e K nos extratos foi determinada por espectrometria de emissão óptica de plasma acoplada indutivamente (ICP-OES, JobinYvon, JY50P, França). A concentração de N total na parte aérea foi determinada pelo método Kjeldahl após digestão sulfúrica (Bremner, 1960).

4.2.4 Determinação da concentração de açúcares solúveis e amido em folhas e raízes

Para a determinação da concentração de glicose, sacarose e amido, amostras de parte aérea e de raízes armazenadas em N₂ líquido na ocasião da coleta, foram liofilizadas e moídas. Para a extração de açúcares solúveis, cerca de 50 mg de amostras de folhas ou raízes foram colocadas em microtubos e adicionado 1 mL de etanol 70%, a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex (5 s) e deixada em repouso por 24 h à temperatura ambiente. Depois, a mistura foi centrifugada (10 min, 4 °C a 14000 rpm) e o sobrenadante recuperado e armazenado. O mesmo procedimento foi repetido três vezes. O *pellet* das amostras foi armazenado em geladeira para posterior utilização na análise da concentração de amido. A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1960). A dosagem de açúcares totais foi realizada pelo método fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956) e a concentração de sacarose, determinada pelo resultado da subtração entre a concentração de açúcares redutores e açúcares totais. Para a quantificação de amido foram utilizados os *pellets* resultantes da extração, ao qual foi adicionado 1 mL de ácido perclórico a 30% para a digestão do material, em seguida os

tubos foram agitados por um vórtex (5 s) e deixados em repouso 24 h (Yemm e Willis, 1954). Então o material foi centrifugado (20 min, 4 °C a 14000 rpm) e seu sobrenadante foi recolhido e utilizado para determinação de açúcares totais pelo método fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956), utilizando glicose como padrão.

4.2.5 Concentração de proteínas solúveis totais e atividade de invertases na raiz

Amostras de raízes frescas e congeladas em N₂ líquido na ocasião da coleta foram maceradas utilizando um homogeneizador de tecidos de alto rendimento (2010 Geno/Grinder®, Metuchen, NJ, Estados Unidos). Inicialmente foi realizada a extração de proteínas solúveis, para o qual 500 mg de raiz macerada foram adicionados a 25 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 1,5 mL de tampão de extração fosfato de potássio 100 mM com EDTA 1 mM e ditioneitol (DTT) 3 mM. A mistura foi homogeneizada em cadinho previamente resfriado em N₂ líquido, acondicionada em microtubos, e centrifugada (30 min, 4 °C a 12000 rpm). O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação de proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (1976).

O extrato proteico foi utilizado para determinação da atividade das invertases (INV) ácida e alcalina das raízes. A reação de INV ácida foi feita em tampão acetato de sódio 1 M a pH 4,5, enquanto que para INV alcalina foi utilizado o tampão Tris-HCl 1 M a pH 7,5. A reação foi realizada em microtubos aos quais foram adicionados 100 µL de extrato proteico de cada amostra, 400 µL de tampão (ácido ou alcalino) com sacarose a 100 mM, totalizando 500 µL. A mistura foi incubada por 1 h a 37 °C e ao término desse período, a reação foi parada utilizando 60 µL de solução básica de Tris 2,5 M e choque térmico a 100 °C por 3 min. Quatro brancos da reação foram feitos, sendo dois com extrato proteico e solução tampão, ácida ou alcalina, sem sacarose e mais dois com solução tampão, ácida ou base, com sacarose a 100 mM e água ultrapura. Posteriormente foi realizada a dosagem de glicose pelo método de Somogyi e Nelson (Nelson, 1960) utilizando 200 µL de amostra da reação em 300 µL de água ultrapura.

4.2.6 Determinação da colonização micorrízica e comprimento do micélio externo total

Ao fim dos primeiros 30 dias do experimento, antes do início dos tratamentos de redução da luminosidade, foram coletadas amostras de raízes de a cinco parcelas experimentais de cada tratamento a fim de verificar a frequência (F) e da intensidade (M) micorrízica dos tratamentos com inoculação de FMA, bem como a ausência de colonização nos tratamentos sem inoculação. Ao final do experimento, após 60 dias, foi feita a coleta

para determinação da colonização micorrízica das plantas. Em ambos os momentos foi empregada a mesma metodologia. As raízes previamente armazenadas em etanol 50% foram lavadas em água corrente, diafanizadas em KOH 2,5% por 24 h a temperatura ambiente, coloridas com solução de tinta de tintureiro a 5% em vinagre por 1 h e 20 min (Vierheilig et al., 1998) e armazenadas em glicerol acidificado. Para estimar a porcentagem de raiz colonizada pelo FMA, 30 fragmentos de raiz de 1 cm foram dispostos sobre lâminas de microscopia e observados em microscópio óptico (Leica DFC295) no aumento de 40× a 200×. Foram quantificadas a presença de estruturas como hifas, arbúsculos e vesículas de FMA para determinar a frequência (F) e a intensidade (M) micorrízicas (Trouvelot et al., 1986).

Para estimar o comprimento do micélio externo total (MET) foi seguido o método de Boddington et al (1999), com modificações. Dessa maneira, 100 mL da areia coletada ao final do experimento foram suspensos em 1500 mL de água, e a mistura foi peneirada em malhas de 0,71 e 0,25 mm, para retirar possíveis fragmentos de raiz e partículas de areia maiores. Então o volume foi recolhido e agitado em liquidificador por 30 s, mantido em repouso por 2 min e uma alíquota de 500 mL foi peneirada em malha de 0,045 mm. Os sedimentos sobre a malha, contendo as hifas extrarradiculares de FMA, foram recolhidos em 11 mL de água ultrapura e em seguida, 5 mL desta solução foram ressuspensos e filtrados a vácuo em membrana de nitrocelulose com reticulado quadriculado. O MET retido pela membrana foi colorido com solução de azul de Tripán 0,05% em glicerol acidificado por 1 min. O comprimento do MET foi avaliado em microscópio óptico (aumento de 125×) com o auxílio de uma lente reticulada 10 × 10, em 64 campos do reticulado da membrana. Somente hifas com características e morfologia de FMA foram consideradas (Melloni et al., 1999). Os resultados foram expressos em m ml^{-1} de substrato.

4.2.7 Obtenção de hifas extrarradiculares para análises por μ -FTIR

A extração de hifas extrarradiculares para a análise por μ -FTIR foi realizada por peneiramento úmido (Gerdemann e Nicolson, 1963). Para isso, 100 mL de areia foram suspensos em 2000 mL de água e essa solução foi peneirada por malhas de 0,71, 0,25 e 0,045 mm. O processo foi repetido por dez vezes e ao final o sedimento retido pela malha de 0,045 mm foi recolhido em 3 mL de água ultrapura. Então o volume foi homogeneizado, colocado sobre um vidro relógio e observado sob microscópio estereoscópico. Após a verificação da presença de fragmentos de hifas de FMA, cerca de 80 μL de amostra foram pipetados sobre substratos de ouro de 5 x 5 mm para análise por μ -FTIR no modo de reflectância. Os substratos contendo as amostras permaneceram em caixa dessecadora por

pelo menos 24 h para secagem. Utilizando o espectromicroscópio de FTIR (Cary 620, Agilent Technologies) foram selecionadas hifas com diâmetro entre 10 e 20 μM e com pouco ou nenhum sedimento ao seu redor.

As análises de FTIR foram realizadas no modo de reflectância utilizando um detector do tipo *Focal Plane Array* (FPA) com resolução espectral de 8 cm^{-1} , número de scans de 256 e no modo *high magnification*. Foram realizadas medidas de pelo menos duas hifas em três repetições por tratamento. O espectro de uma superfície de ouro limpa foi tomado como referência para a correção do *background*. As imagens hiperespectrais foram tratadas pelo software Orange: Data Mining Toolbox in Python (University of Ljubljana, Slovenia). Espectros referentes à média obtida da análise de 3 hifas por tratamento foram gerados. Os espectros tiveram seu *baseline* corrigido (modo *Rubber Band*) e foram suavizados com a função *Gaussian Smoothing*. Também foram geradas imagens hiperespectrais das hifas extrarradiculares analisadas, dos quais foram selecionados mapas de localização espacial dos compostos de maior interesse.

4.2.8 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (*two-way* ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Antes das análises estatísticas, os dados expressos em porcentagem foram transformados em raiz quadrada de arco-seno e os dados relativos a contagens transformados em $\log x + 1$. Foi realizada análise de correlação de Pearson ($P < 0,05$). Também foi feita a análise de componentes principais (PCA [Principal Component Analysis]) para reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados e identificar variáveis associadas aos valores mais altos de proporção de variância total. Foram utilizados os softwares Orange: Data Mining Toolbox in Python (University of Ljubljana, Slovenia) e Minitab® 17 (software estatístico Minitab 17).

4.3 Resultados

4.3.1 Parâmetros fotoquímicos, índices de pigmentos e balanço de nitrogênio

Durante os 30 dias em que as plantas estiveram submetidas aos tratamentos de redução da intensidade luminosa, foram realizadas medidas semanais dos índices de pigmentos e dos parâmetros fotoquímicos. As plantas não micorrizadas (N) sob luz média (M) e baixa (L), N-M e N-L, apresentaram aumento do índice de clorofila ao longo das semanas de sombreamento, sendo que nos demais tratamentos foi observada a diminuição

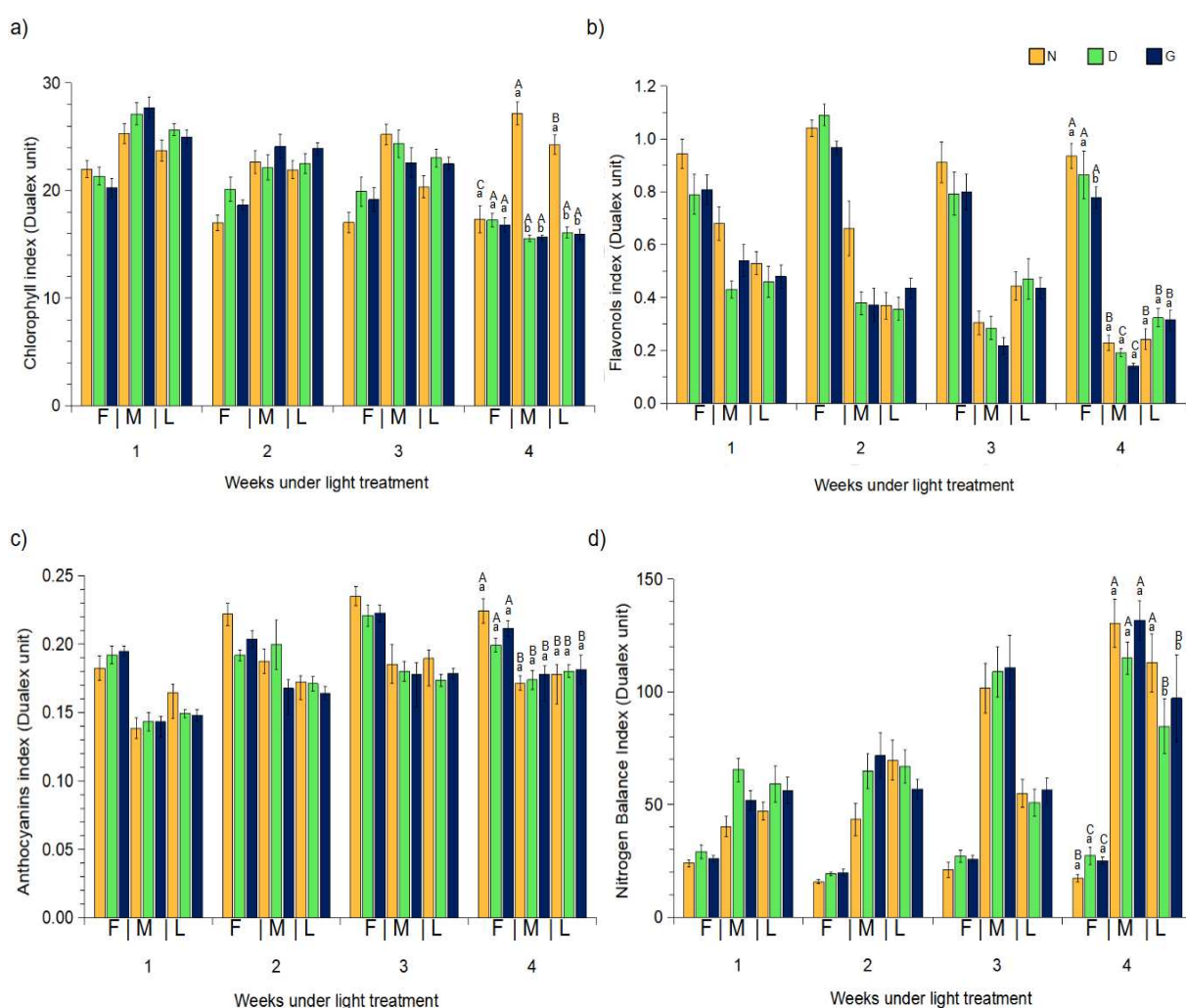
gradual deste pigmento com o decorrer do tempo (Fig. 4.2 a). Na quarta e última medida semanal, foi possível observar diferenças significativas no índice de clorofila das plantas não micorrizadas em condições de luz média, N-M, e luz baixa, N-L, sendo em média 59% maior do que em plantas micorrizadas nas mesmas condições de luz, D-M, G-M, D-L e G-L (Fig. 4.2 a).

O índice de flavonóis teve aumento em folhas de plantas sob luz plena (F) e média (M) no decorrer das 4 semanas (Fig. 4.2 b). Ao final das 4 semanas, as folhas de plantas sob luz plena (F) apresentaram o índice de flavonóis cerca de 265% maior em comparação às plantas sob luz média (M) e baixa (L) (Fig. 4.2 b). Além disso, as plantas do tratamento G-F apresentaram índice de flavonóis inferior às plantas N-F e D-F (Fig. 4.2 b). Para os dois tratamentos com inoculação de FMA na condição de luz baixa, D-L e G-L, o índice de flavonóis foi maior do que na condição de luz média, D-M e G-M, diferentemente das plantas não inoculadas por FMA, N-M e N-L, em que o índice de flavonóis não apresentou variação entre plantas sob luz média ou baixa (Fig. 4.2 b). Para o índice de antocianinas foliares, houve pouca variação ao longo das primeiras três semanas do sombreamento (Fig. 4.2 c). Na quarta semana foi possível observar um decréscimo de cerca de 20% em folhas de plantas sob luz média e baixa, que por sua vez não apresentaram variações devido à inoculação ou não de FMA (Fig. 4.2 c).

O índice de balanço de nitrogênio (NBI [*Nitrogen Balance Index*]) apresentou tendência de aumento ao longo das quatro semanas de medidas em plantas sob luz média (M) e luz baixa (L), enquanto em plantas sob luz plena (F) não houve diferenças significativas (Fig. 4.2 d). Na última semana de medidas, as plantas sob luz plena (F) apresentaram NBI em torno de 79% menor em comparação às plantas sob luz média ou baixa (Fig. 4.2 d). Sob luz média, o NBI não teve influência da inoculação de FMA, enquanto sob luz baixa, as plantas não inoculadas com FMA apresentaram maior NBI do que plantas inoculadas (Fig. 4.2 d).

A eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII [*photosystem II*]) (Fv/Fm) apresentou pouca variação ao longo das quatro semanas de análises (Fig. 4.2 e). No entanto, na quarta semana, independentemente da inoculação de FMA, o Fv/Fm se manteve cerca de 16% maior em plantas sob luz baixa do que em plantas sob luz plena ou média (Fig. 4.2 e). Quanto ao *quenching* não-fotoquímico (NPQ [*Non-Photochemical Quenching*]), foi observado aumento nas plantas sob luz média ao longo das quatro semanas (Fig. 4.2 f). Nas plantas sob luz plena também foi possível notar o aumento do NPQ (Fig. 4.2 f). Na quarta semana, plantas sob luz plena e média apresentaram NPQ em torno de 5 vezes maior em comparação às plantas sob luz baixa (Fig. 4.2 f).

O rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII) aumentou ao longo das quatro semanas em plantas sob luz média (Fig. 4.2 g), enquanto em plantas sob luz baixa houve decréscimo acentuado do Φ PSII (Fig. 4.2 g). Na quarta semana, plantas sob luz plena inoculadas com FMA, D-F e G-F, apresentaram Φ PSII 27% maior em comparação às plantas sem inoculação, N-F (Fig. 4.2 g). Sob luz média não houve diferenças significativas entre os tratamentos de inoculação do FMA. Já para a condição de luz baixa, plantas do tratamento G-L apresentaram maior Φ PSII do que plantas dos tratamentos N-L ou D-L. (Fig. 4.2 g). Plantas sob luz baixa apresentaram valores de Φ PSII 88% mais baixos do que plantas sob luz média ou plena (Fig. 4.2 g).



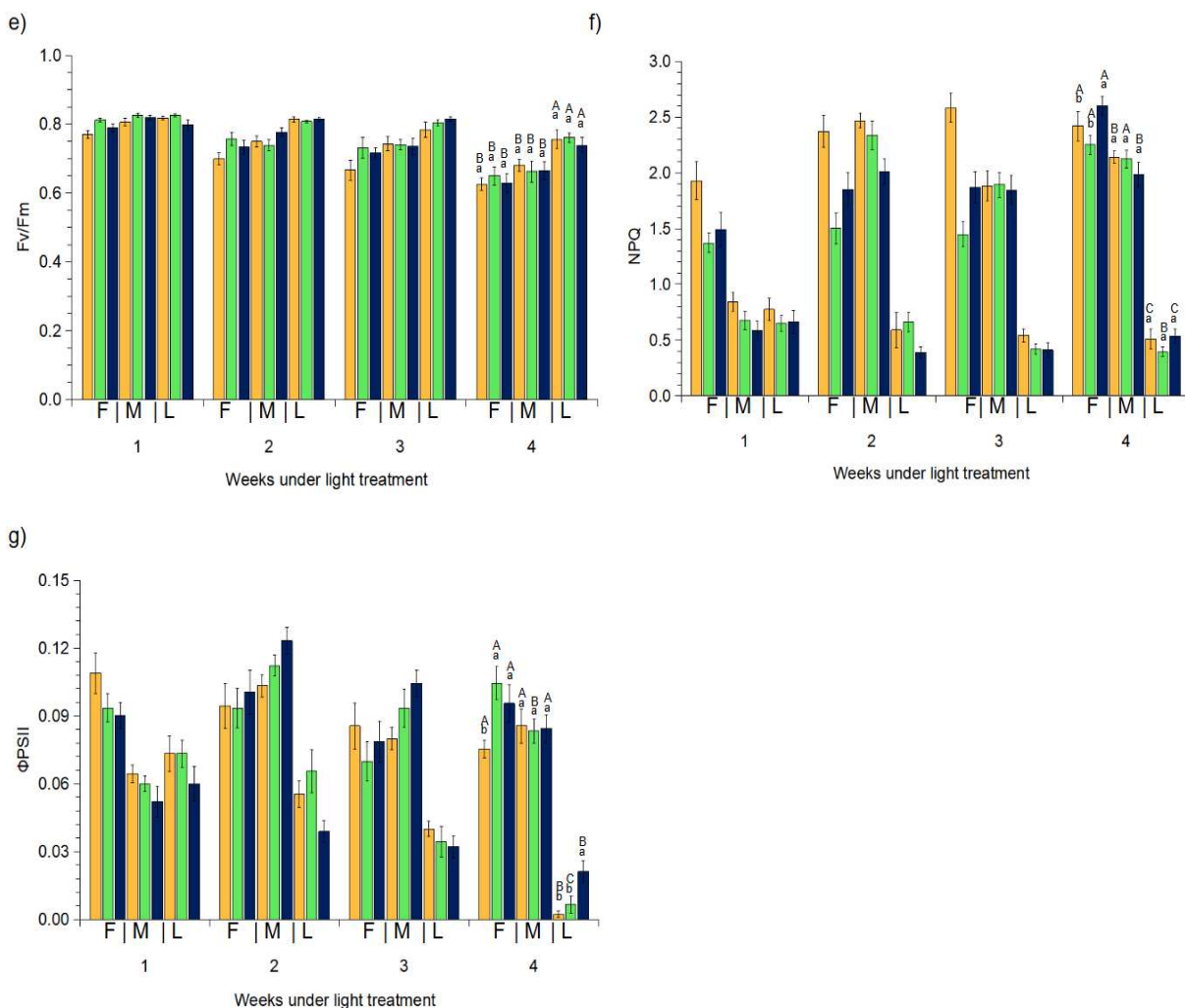


Figura 4.2 Pigmentos foliares e parâmetros fotoquímicos. Índices foliares de clorofila (a), flavonóis (b), antocianina (c), índice de balanço de nitrogênio (NBI) (d), eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) (e), *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (f), rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII) (g) de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2 Produção de biomassa vegetal

As plantas sob luz baixa, independentemente da inoculação de FMA, apresentaram menor produção de biomassa da parte aérea do que plantas sob luz média ou plena (Fig. 4.3 a). Plantas sob luz plena e média apresentaram produção similar de biomassa da parte aérea e em ambos os casos as plantas micorrizadas apresentaram maior produção de biomassa do que plantas não micorrizadas (Fig. 4.3 a). Sob luz plena, a biomassa da parte aérea de plantas dos tratamentos D e G foi até 42% maior do que plantas do tratamento N. Sob luz média, as plantas dos tratamentos G e D apresentaram 41% e

24% maior produção de biomassa da parte aérea do que plantas do tratamento N, respectivamente (Fig. 4.3 a). Em relação à altura da parte aérea, as plantas sob luz baixa foram cerca de 24% maiores em comparação às plantas sob luz plena, mas similares às plantas sob luz média (Fig. 4.3 b). Sob luz média, as plantas micorrizadas apresentaram entre 41 e 26% maior altura da parte aérea do que plantas não micorrizadas, as plantas inoculadas do tratamento G alcançaram maior altura do que as do tratamento D (Fig. 4.3 b). A micorrização não teve influência significativa na altura das plantas sob luz plena e baixa (Fig. 4.3 b).

O número de perfilhos por vaso foi favorecido pela presença de FMA. Em todos os tratamentos de luminosidade, plantas micorrizadas apresentaram maior número de perfilhos em comparação às plantas não micorrizadas (Fig. 4.3 c). As plantas não micorrizadas sob luz média, N-M, apresentaram maior número de perfilhos do que plantas sob luz plena ou baixa, N-F e N-L (Fig. 4.3 c). Sob luz baixa, as plantas inoculadas com *R. irregularis* (D), D-L, apresentaram menor número de perfilhos do que plantas sob luz plena e média, D-F e D-M (Fig. 4.3 c). Em plantas inoculadas com *G. intraradices* (G), o número de perfilhos não teve influência do tratamento de luz (Fig. 4.3 c). A LMA não teve influência significativa da inoculação de FMA, mas decresceu com o aumento do sombreamento. Plantas sob luz baixa apresentaram a menor LMA, enquanto plantas sob luz plena apresentaram a maior LMA (Fig. 4.3 d).

O comprimento total das raízes e a área superficial seguiram um padrão semelhante de resposta aos fatores estudados (Fig. 4.4 a-b). Em ambos os casos, raízes de plantas sob luz plena não responderam significativamente à micorrização (Fig. 4.4 a-b). O comprimento e a área superficial das raízes diminuíram em plantas sob luz baixa independentemente do tratamento de inoculação do FMA (Fig. 4.4 a-b). Sob luz baixa foi observado, em média, valores 65% menores do que em plantas sob luz plena e luz média (Fig. 4.4 a-b).

A produção de biomassa das raízes foi fortemente influenciada pela intensidade luminosa, com redução em torno de 80% para plantas sob luz baixa em comparação ao observado nas plantas sob luz plena e média. A inoculação do FMA também teve influência na produção de biomassa de raiz. Sob luz plena, plantas não micorrizadas (N) apresentaram biomassa de raiz cerca de 35% menor do que plantas micorrizadas, D-F e G-F, sendo que entre estas a produção de biomassa de raiz não diferiu (Fig. 4.4 c). Em plantas sob luz média e baixa a produção de biomassa de raiz não respondeu à inoculação do FMA (Fig. 4.4 c).

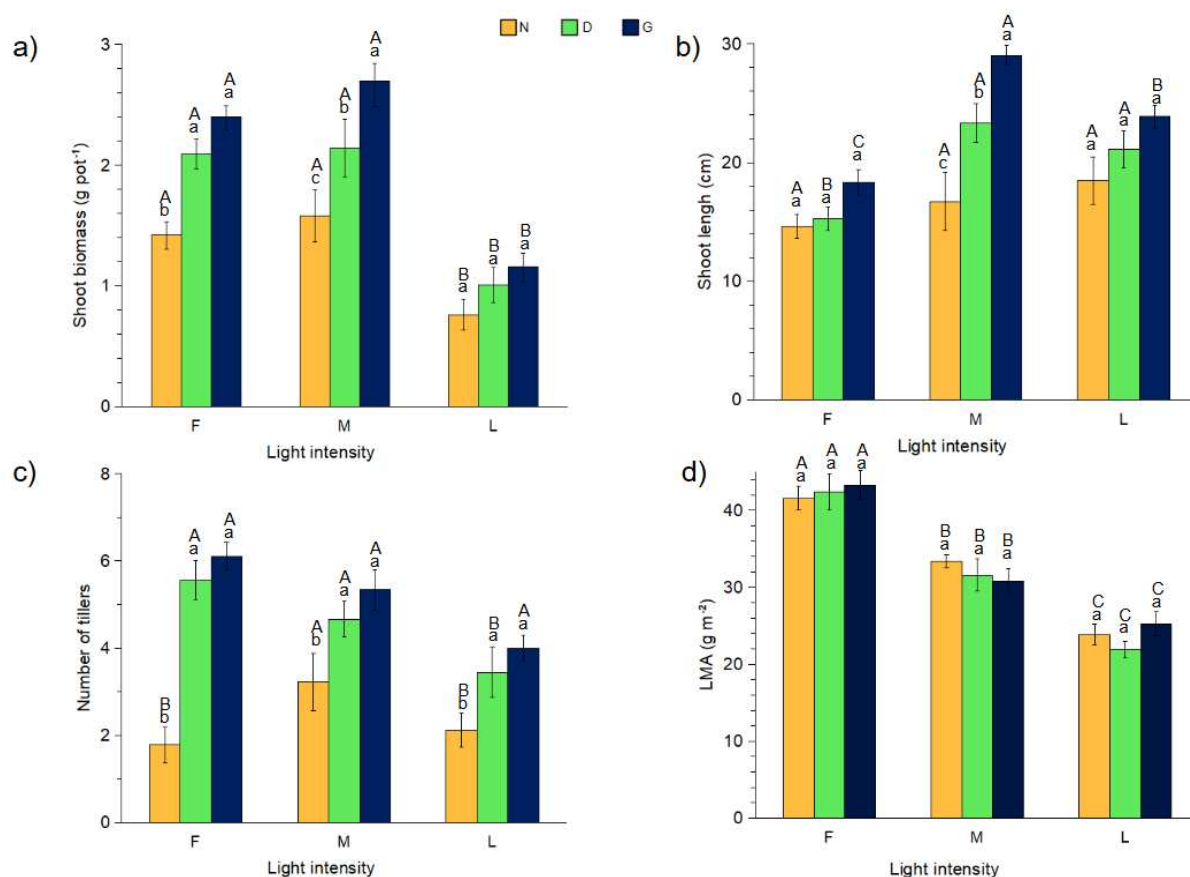


Figura 4.3 Parâmetros biométricos da parte aérea. Biomassa da parte aérea (a), altura da parte aérea (b), número de perfilhos (c) e massa foliar por área (LMA) (d) de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A razão raiz: parte aérea não respondeu significativamente à micorrização (Fig. 4.4 d). Entretanto, a intensidade luminosa exerceu influência significativa, com plantas sob luz plena apresentando 42% maior razão raiz:parte área do que plantas sob luz média e 72% maior em relação às plantas sob luz baixa (Fig. 4.4 d). O diâmetro médio das raízes de plantas não micorrizadas sob luz plena, N-F, foi 20% menor do que o de raízes de plantas colonizadas por FMA, D-F e G-F (Fig. 4.4 e). Sob luz média e baixa, o diâmetro médio das raízes não respondeu significativamente à micorrização (Fig. 4.4 e). Entretanto, sob luz baixa as plantas apresentaram menor diâmetro médio de raiz do que plantas sob luz média ou plena (Fig. 4.4 e).

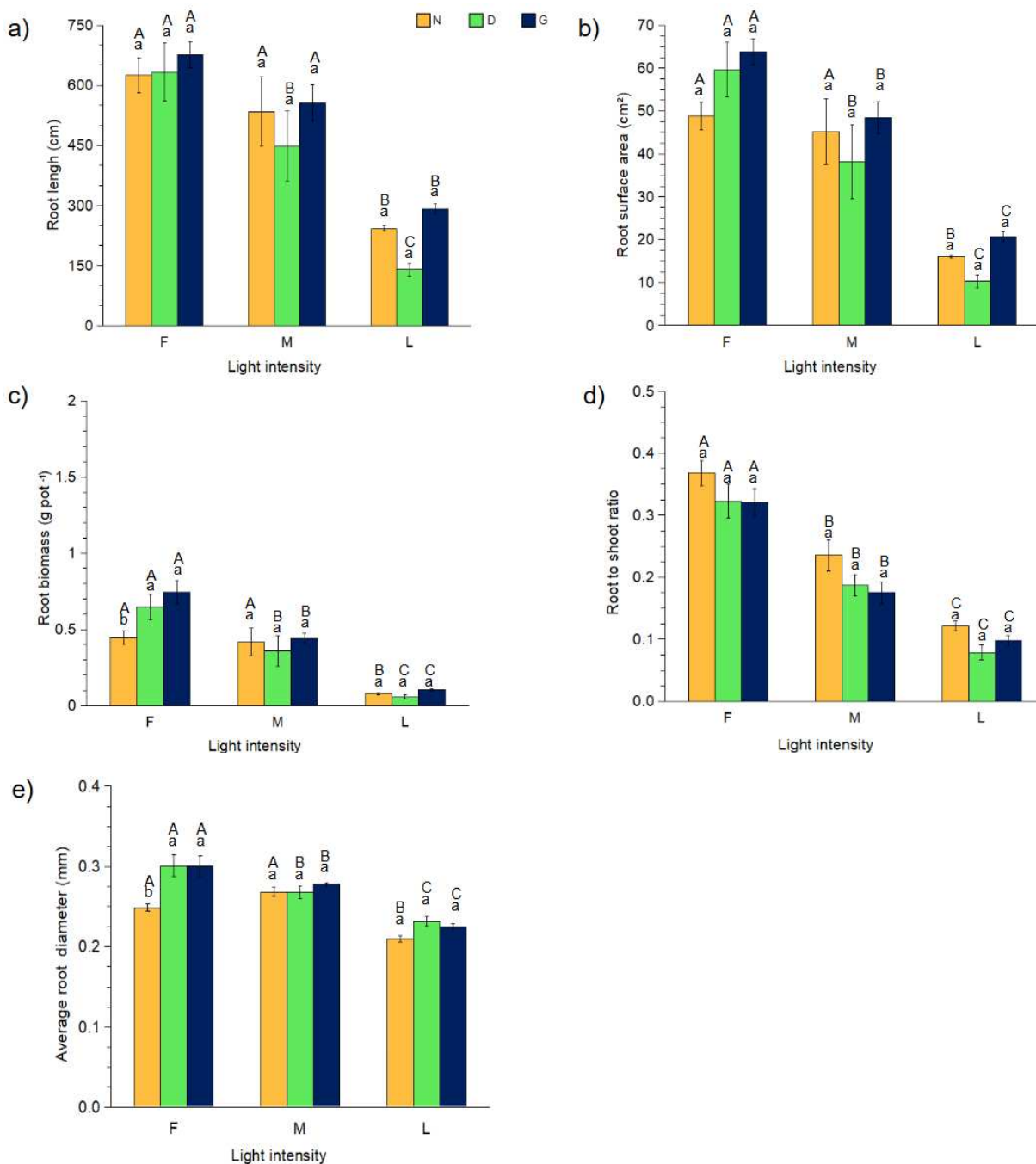


Figura 4.4 Parâmetros biométricos de raízes. Comprimento (a), área superficial (b), produção de biomassa (c), razão raiz: parte aérea (d) e diâmetro médio (e) de raízes de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.3 Concentração e conteúdo de nutrientes da parte aérea

A concentração de N na parte aérea não foi influenciada significativamente pelas condições de luminosidade e de micorrização (Fig. 4.5 a). A concentração de P foi, em geral,

maior em plantas sob luz baixa do que sob luz média ou plena, independentemente da micorrização (Fig. 4.5 b). Sob luz baixa, foi possível notar maior concentração de P nas plantas micorrizadas, D-L e G-L, do que nas plantas não inoculadas com FMA, N-L (Fig. 4.5 b). Já a concentração de K na parte aérea também foi, em geral, maior em plantas sob luz baixa do que sob luz média e plena (Fig. 4.5 c). Sob luz média, as plantas não inoculadas com FMA, N-M, apresentaram menor concentração de K do que plantas micorrizadas, D-M e G-M (Fig. 4.5 c).

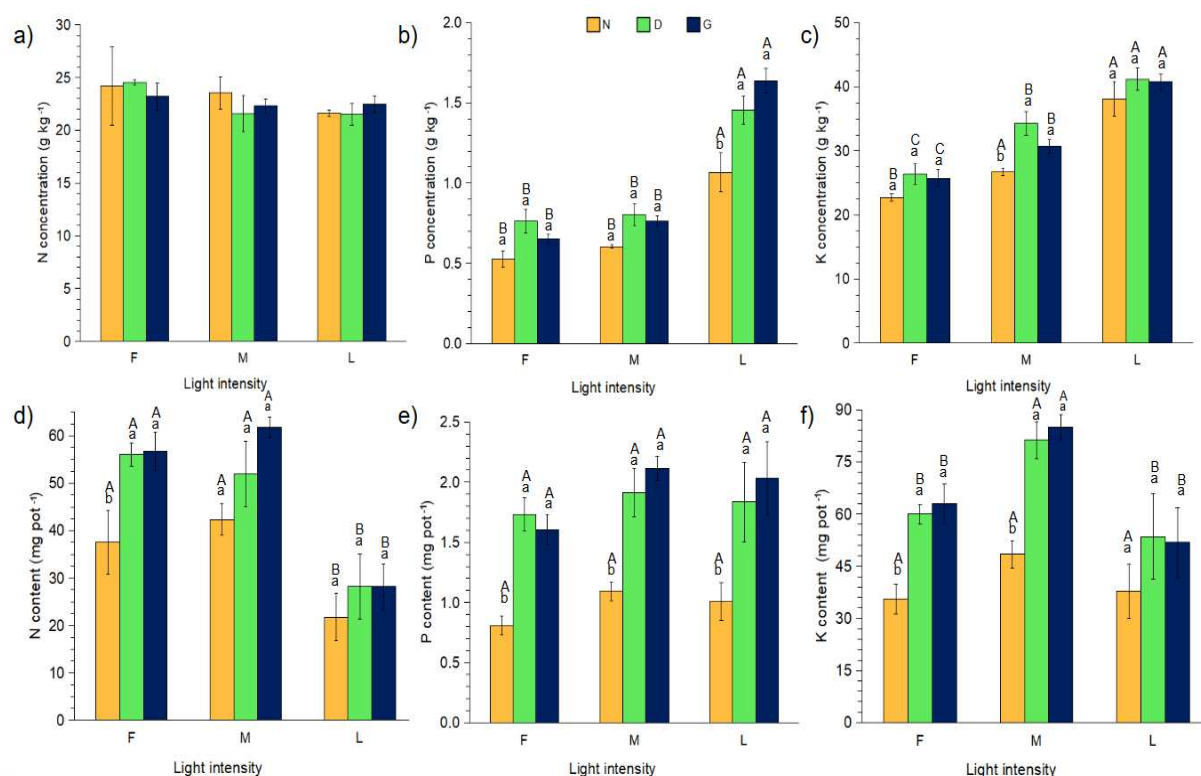


Figura 4.5 Concentrações e conteúdos de N, P e K foliares. Concentração de N (a), concentração de P (b), concentração de K (c), conteúdo de N (d), conteúdo de P (e), conteúdo de K (f) de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey (p<0,05).

O conteúdo de N foi menor em plantas sob luz baixa do que sob luz média ou alta (Fig. 4.5 d). A micorrização não causou diferenças significativas no conteúdo de N de plantas sob luz média e luz baixa. Entretanto, sob luz plena, plantas micorrizadas, D-F e G-F, apresentaram conteúdo de N cerca de 51% maior do que plantas não micorrizadas, N-F (Fig. 4.5 d). Já o conteúdo de P da parte aérea não foi influenciado pelas condições de luminosidade (Fig. 4.5 e). Quanto à inoculação de FMA, independentemente do tratamento de luz, as plantas não micorrizadas apresentaram conteúdo de P em média 48% menor em

comparação às plantas micorrizadas (Fig. 4.5 e). O conteúdo de K da parte área de plantas não micorrizadas sob luz plena e luz média foi menor do que em plantas colonizadas por FMA (Fig. 4.5 f). Já sob luz baixa o conteúdo de K da parte área de plantas micorrizadas, D-L e G-L, foi similar ao de plantas não micorrizadas, N-L (Fig. 4.5 f). Enquanto em plantas não micorrizadas a intensidade luminosa não influenciou o conteúdo de K, em plantas micorrizadas sob luz média, D-M e G-M, o conteúdo de K foi maior do que em plantas micorrizadas sob luz plena, D-F e G-F, e sob luz baixa, D-L e G-L (Fig. 4.5 f).

4.3.4 Concentrações de glicose, sacarose e amido vegetal

Os níveis de luminosidade não influenciaram na concentração de glicose da parte aérea (Fig. 4.6 a). Em relação à micorrização, plantas micorrizadas sob luz plena, D-F e G-F, apresentaram maior concentração de glicose na parte aérea do que plantas não micorrizadas, N-F (Fig. 4.6 a). Já nas condições de luz média e luz baixa, plantas não micorrizadas e as colonizadas pelo FMA *R. irregularis* DAOM197198 apresentaram concentração de glicose da parte aérea similares entre si, mas menores do que plantas colonizadas por *G. intraradices* IAC, as quais tiveram concentração de glicose em média 30% maior (Fig. 4.6 a). A concentração de sacarose na parte aérea não respondeu à colonização micorrízica (Fig. 4.6 b). Plantas micorrizadas por *G. intraradices* IAC apresentaram concentração de sacarose menor quando crescidas sob luz média e baixa em comparação às plantas sob luz plena (Fig. 4.6 b).

A concentração de amido da parte aérea de plantas micorrizadas por *G. intraradices* IAC foi influenciada pela condição de luminosidade, que reduziu com a diminuição da intensidade luminosa. Nas plantas micorrizadas com *G. intraradices* IAC a concentração de amido foi menor em G-L. Sob luz plena, plantas micorrizadas por *G. intraradices* IAC, G-F, apresentaram concentração de amido da parte aérea em média 45% maior em comparação às plantas não micorrizadas, N-F, ou colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198, D-F (Fig. 4.6 c). Já sob luz média e luz baixa, a concentração de amido na parte aérea não respondeu à micorrização (Fig. 4.6 c).

Sob luz plena e luz média, a concentração de glicose nas raízes de plantas micorrizadas, D-F, G-F, D-M e G-M, foi similar entre si, e cerca de 136% e 124% maior do que o observado em plantas não micorrizadas, N-F e N-M, respectivamente (Fig. 4.6 d). Plantas sob luz baixa colonizadas por *G. intraradices* IAC, G-L, apresentaram cerca de 166% maior concentração de glicose na raiz do que plantas dos tratamentos D-L ou N-L (Fig. 4.6 d). Com a redução da luminosidade, houve diminuição da concentração de glicose

nas raízes das plantas colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198 de até 65% em relação ao observado em luz plena (Fig. 4.6 d).

Quanto à concentração de sacarose nas raízes, em plantas sob luz plena não houve diferenças significativas devido à micorrização (Fig. 4.6 e). Em plantas sob luz média, a concentração de sacarose nas raízes de plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-M, foi 74% menor do que em plantas não inoculadas, N-M ou inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-M (Fig. 4.6 e). Sob luz baixa, as plantas micorrizadas, D-L e G-L, tiveram 55% maior concentração de sacarose nas raízes do que plantas não micorrizadas, N-L (Fig. 4.6 e). A concentração de sacarose da raiz foi afetada significativamente pela luz em plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC, em que sob luz baixa e média, G-L e G-M, sua concentração foi cerca de 52% maior do que sob luz plena, G-F (Fig. 4.6 e). Quanto à concentração de amido nas raízes, plantas sob luz plena e inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-F, apresentaram maior concentração do que plantas não inoculadas, N-F, ou inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-F, (Fig. 4.6 f). Sob luz média e baixa, a concentração de amido nas raízes não respondeu à micorrização (Fig. 4.6 f).

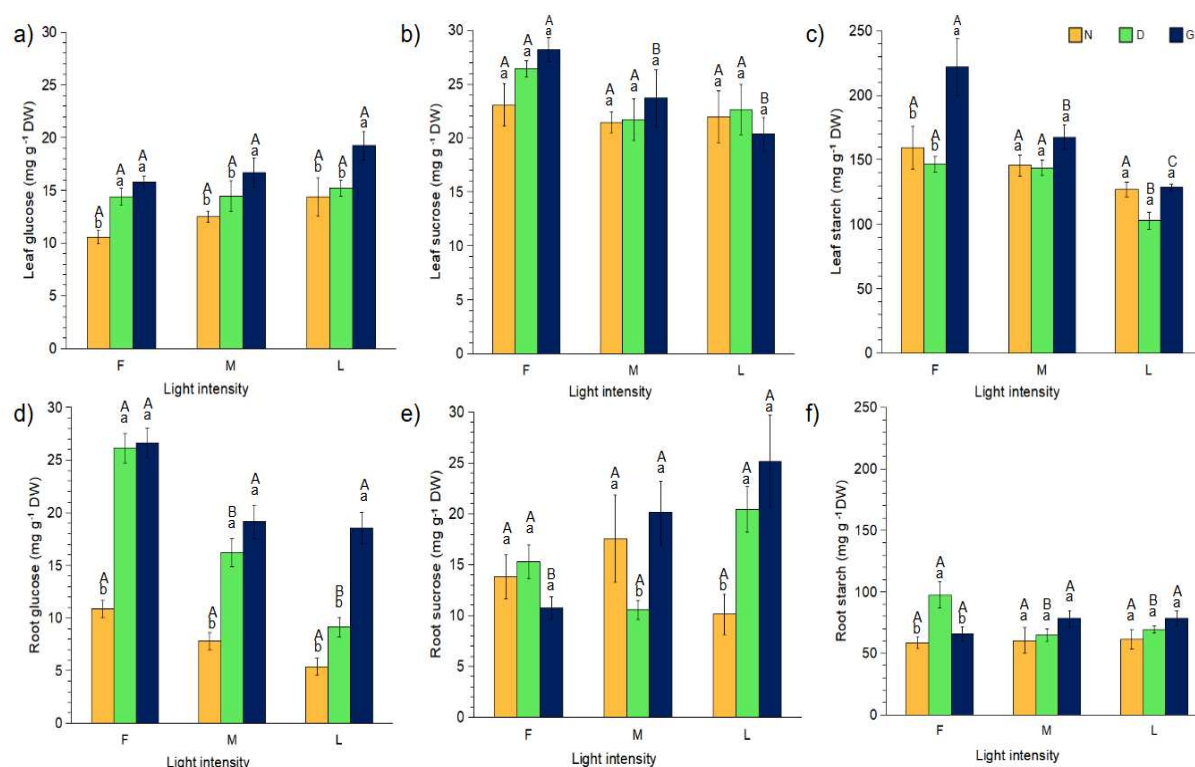


Figura 4.6 Medidas de carboidratos na planta. Concentração de glicose (a, d), sacarose (b, e) e amido (c, f) na parte aérea (a, b, c) e raiz (d, e, f) de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.5 Atividade das invertases ácida e alcalina nas raízes e conteúdo de proteínas solúveis totais

Em geral, não houve diferença significativa da atividade da invertase ácida ou alcalina em função das condições de luz ou da inoculação de FMA (Fig. 4.7 a-b). Apenas em plantas sob luz baixa e inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-L, houve menor atividade da invertase alcalina do que em raízes de plantas não inoculadas ou inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, no qual sua atividade foi em média 75% mais baixa (Fig. 4.7 b).

Na condição de luz plena, a quantidade de proteínas solúveis totais nas raízes foi 46% maior em plantas micorrizadas, D-F e G-F, do que em plantas não micorrizadas, N-F (Fig. 4.7 c). Sob luz média, plantas micorrizadas com *G. intraradices*, G-M, apresentaram conteúdo de proteínas solúveis totais 71% maior do que o observado em raízes de plantas dos outros tratamentos, N-M e D-M (Fig. 4.7 c). Sob luz baixa, raízes de plantas micorrizadas, D-L e G-L, apresentaram conteúdo similar de proteínas solúveis, sendo cerca de 38% maior do que em plantas não micorrizadas, N-L (Fig. 4.7 c). Em geral, o conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes foi influenciado pela condição de luz, tendo sido significativamente menor sob luz baixa do que sob luz plena (Fig. 4.7 c).

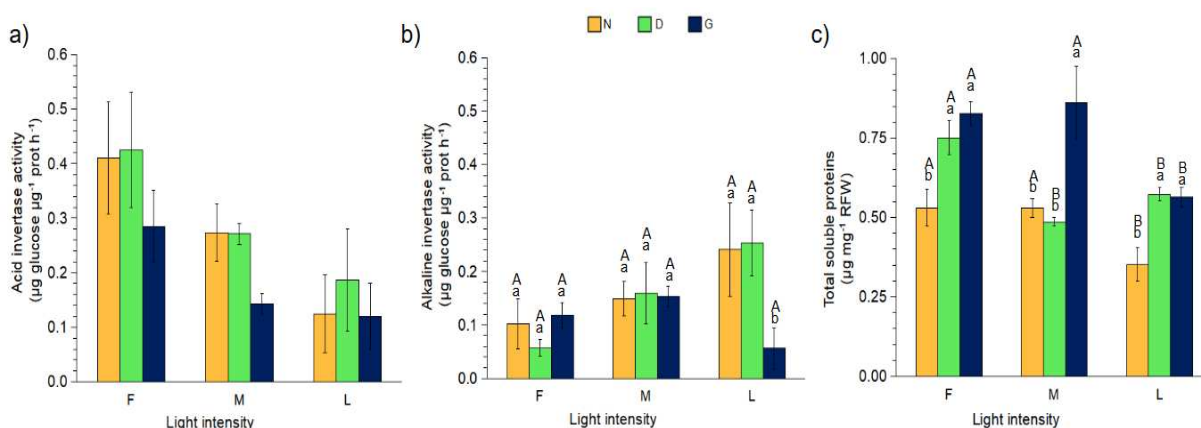


Figura 4.7 Atividade de invertases e conteúdo de proteínas solúveis. Atividade das invertases ácidas (a), atividade das invertases alcalinas (b) e proteínas solúveis totais (c) de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.6 Colonização micorrízica intrarradicar e comprimento do micélio externo total

A colonização micorrízica antes do início do tratamento de sombreamento mostrou que não houve diferenças significativas na intensidade ou frequência micorrízicas das raízes entre plantas inoculadas com ambos os inóculos de FMA, mantendo-se em torno de 100% e 70%, respectivamente (Fig. 4.8 a-b). Também não foi observada presença de estruturas típicas da associação com FMA nas raízes de plantas não inoculadas.

No final do experimento, após 30 dias sob os tratamentos de sombreamento, foi observada a colonização micorrízica (Fig 3.9 a-f) e analisados os parâmetros de frequência da colonização (F), intensidade da colonização (M), abundância de arbúsculos no sistema radicular (A) e abundância de vesículas no sistema radicular (V), bem como o comprimento do micélio externo total (MET) (Fig. 4.10 a-e). Raízes de plantas não inoculadas não apresentaram estruturas relacionadas à micorriza arbuscular.

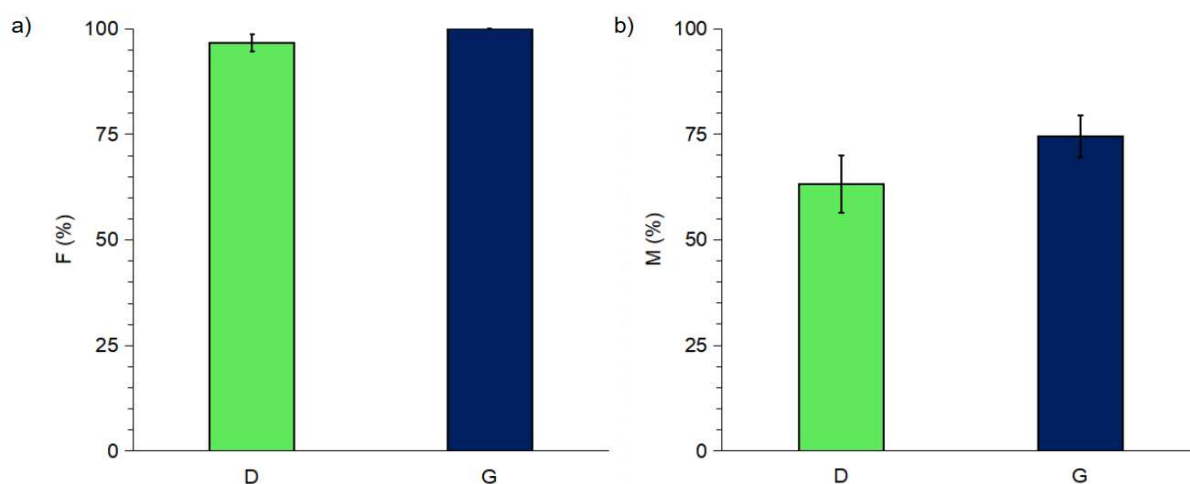


Figura 4.8 Colonização intrarradicular inicial. Frequência da colonização micorrízica arbuscular (F) (a), intensidade da colonização micorrízica arbuscular (M), (b) de raízes de *U. decumbens* inoculadas com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G) antes da aplicação do tratamento de sombreamento.

Em plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198 a frequência de colonização intrarradicular não respondeu à redução de luminosidade, mantendo-se em torno de 95% (Fig. 4.10 a). Em plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC a frequência de colonização intrarradicular se manteve em torno de 96% sob condições de luz plena e média, mas sob luz baixa houve um decréscimo de 15% na frequência micorrízica (Fig. 4.10 a). A intensidade da colonização intrarradicular em plantas sob luz plena e média foi similar em plantas colonizadas por ambos os inóculos de FMA (Fig. 4.10 b). Sob luz baixa, plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-L, apresentaram intensidade de micorrização 21% menor do que plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-L (Fig. 4.10 b). A intensidade de colonização intrarradicular de plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC foi

mais sensível à redução da luminosidade com redução de 26 e 44% sob luz média e baixa, respectivamente (Fig. 4.10 b).

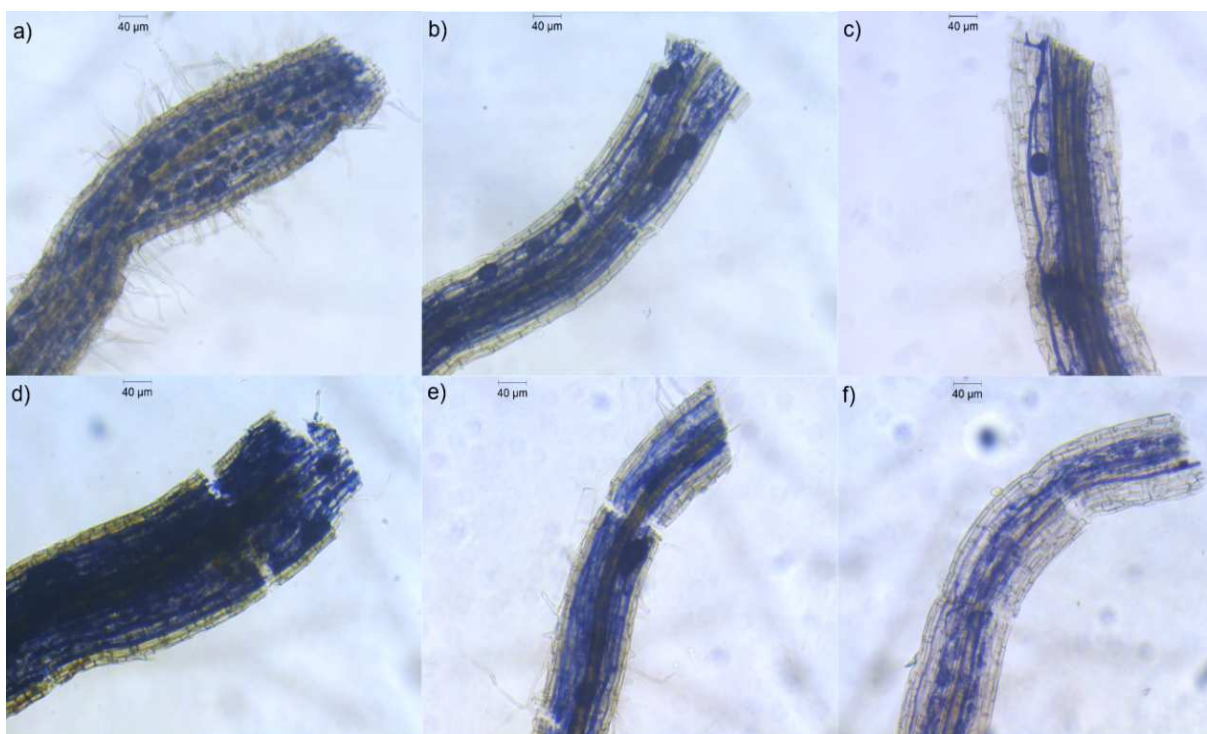


Figura 4.9 Microfotografias de fragmentos de raízes colonizados por FMA. Raízes de *U. decumbens* colonizadas pelos FMA *R. irregularis* DAOM197198 (a, b, c) e *G. intraradices* IAC (d, e, f), sob luz plena (a, d), média (b, f) e baixa (c, f).

Sob luz plena, raízes de plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-F, apresentaram abundância de arbúsculos e vesículas 25 e 30% maiores, respectivamente, do que raízes de plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-F (Fig. 4.10 c-d). Já sob luz média e baixa, plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-M, tiveram abundância de arbúsculos 30% e 45% maiores, respectivamente, do que plantas inoculadas com *G. intraradices* IAC, G-M (Fig. 4.10 c), assim como sob luz baixa, em que a abundância de vesículas foi 50% maior em raízes de plantas inoculadas com *R. irregularis* DAOM197198, D-L (Fig. 4.10 c-d). O comprimento do MET não foi influenciado pelas condições de luminosidade e foi similar para ambos os inóculos de FMA (Fig. 4.10 e).

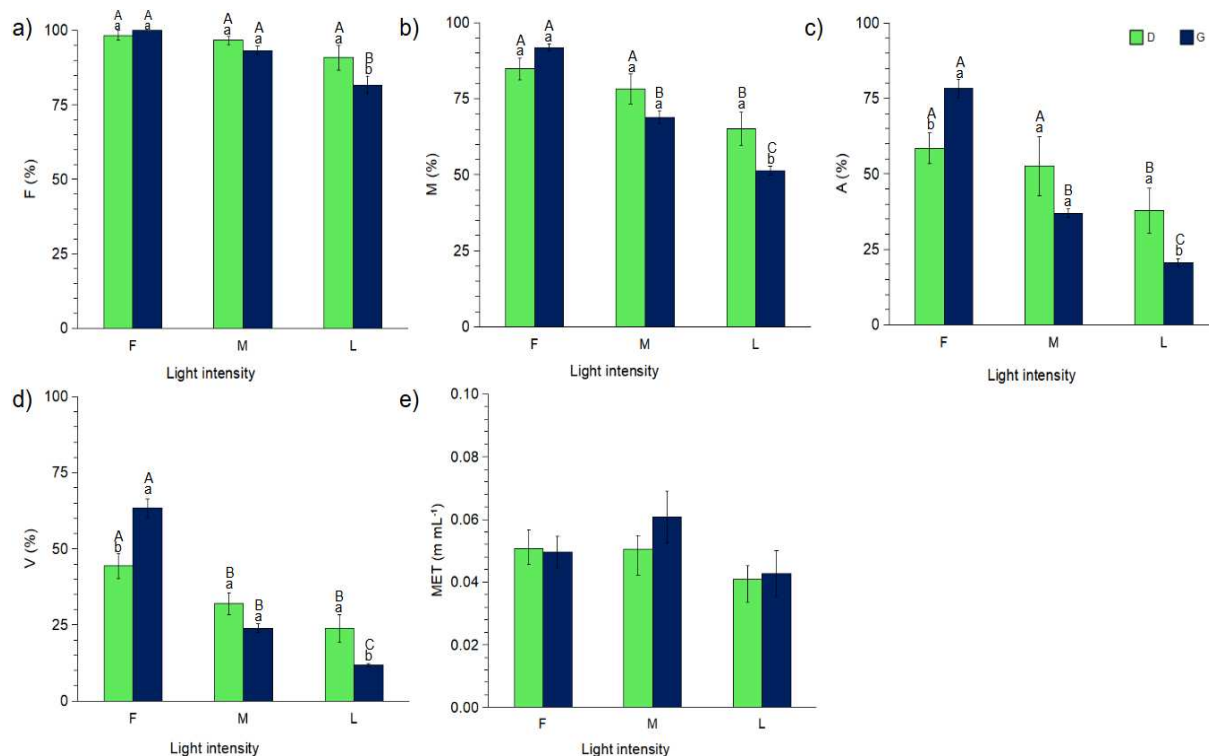


Figura 4.10 Colonização intrarradicular após coleta. Frequência da colonização micorrízica arbuscular (F) (a), intensidade da colonização micorrízica arbuscular (M) (b), abundância de arbuscúlos (A) (c), abundância de vesículas (V) (d) e comprimento do micélio externo total (MET) (e) de raízes e substrato de plantas de *U. decumbens* expostas à luz plena (F), média (M) e baixa (L), inoculadas ou não (N) com *R. irregularis* DAOM 197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos de luz dentro do mesmo tratamento de inoculação de FMA e letras minúsculas diferentes diferenças significativas entre tratamentos de inoculação dentro do mesmo tratamento de luz, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.7 Análise das hifas extrarradiculares por μ -FTIR

A composição de hifas extrarradiculares de FMA foi analisada por μ -FTIR. Os espectros médios referentes às hifas extrarradiculares extraídas do substrato das plantas sob cada tratamento de luz e inoculação de FMA foram plotados e analisados em conjunto (Fig. 4.11 a-c) e individualmente (Figs. 3.12 e 3.13). É possível notar que os seis espectros de hifas de FMA, apesar de apresentarem diferenças pontuais quanto à intensidade de absorbância e presença de alguns picos, no geral apresentaram um padrão similar ao longo dos espectros analisados (Fig. 4.11 a-c). Foram observadas as regiões de lipídios, 3000–2800 cm^{-1} , proteínas, 1700–1500 cm^{-1} , e carboidratos 1200–950 cm^{-1} (Movasaghi et al., 2008). É interessante ressaltar o pico referente à região dos carboidratos, que é formado por uma área de grande absorbância proeminente, no qual se formam três ondulações principais nas regiões 1160–1150 cm^{-1} , 1120–1100 cm^{-1} e 1040–1020 cm^{-1} (Fig. 4.11 b-c). Essas três faixas indicam principalmente a presença de carboidratos, mas também ocorrem

vibrações referentes à compostos fosfatados, como ácidos nucleicos e moléculas fosforiladas (Movasaghi et al., 2008).

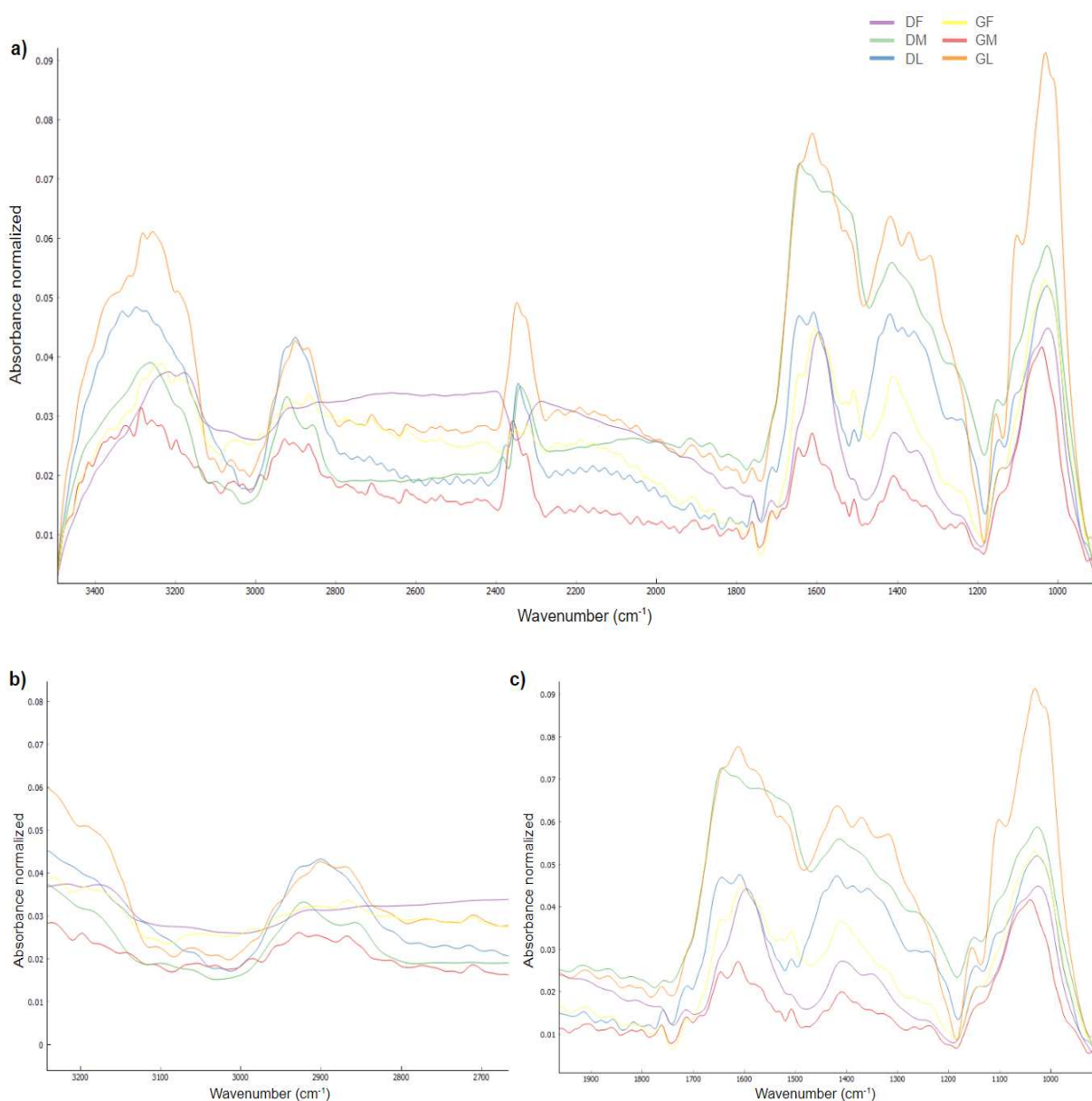


Figura 4.11 Espectros das hifas extrarradiculares. Hifas associadas à micorriza arbuscular entre plantas de *U. decumbens* e *R. irregularis* DAOM197198 (D) ou *G. intraradices* IAC (G) submetidas a a baixa (L), média (M) e plena (F) intensidades luminosas, sendo: espectro completo (3400 a 950 cm^{-1}) (a) e regiões de interesse composicional (3200 a 2700 cm^{-1}) (b) e (1900 a 1000 cm^{-1}) (c). D-F em roxo, D-M em verde, D-L em azul, G-F em amarelo, G-M em vermelho e G-L em laranja.

Nos espectros referentes às hifas extrarradiculares dos tratamentos D-L, G-M e G-L observou-se a formação de um pico entre os números de onda 920 cm^{-1} e 910 cm^{-1} . Essa região do espectro corresponde à compostos com ligações fosfodiéster, como os presentes nos ácidos nucleicos, e ligações C-H, que podem estar relacionadas à compostos como carboidratos ou proteínas (Movasaghi et al., 2008; Singh et al., 2014; Lopes et al.,

2016). Os picos presentes nos espectros foram identificados conforme os tipos de vibrações entre as ligações moleculares referentes à cada região de número de onda (Tabela 3.1).

Foi possível notar que as hifas extrarradiculares de cada um dos FMA estudados apresentaram particularidades características em sua conformação dos espectros. Para as hifas do FMA *R. irregularis* DAOM197198 sob os diferentes tratamentos de luz, D-F, D-M e D-L, por exemplo, os picos que ocorrem na região entre 1450 e 1200 cm^{-1} possuem formatos muito similares (Fig. 4.12 a-c). O mesmo pode ser observado na região entre 1700 e 1500 cm^{-1} para os espectros das hifas extrarradiculares de *G. intraradices* IAC sob os três tratamentos de luz, G-F, G-M e G-L, que apesar da variação na intensidade do sinal dos picos, sua conformação é bastante similar (Fig. 4.13 a-c).

Analisando comparativamente os espectros das hifas extrarradiculares de *R. irregularis* DAOM197198 sob os diferentes tratamentos de luz, foi possível observar que apesar da presença de sinal de intensidade positiva na região de absorção de lipídios (2700 a 3000 cm^{-1}), hifas D-F apresentaram a formação de um pico pouco delimitado e disforme em comparação aos espectros dos tratamentos D-M e D-L (Fig. 4.12 b). O espectro de hifas do tratamento D-L, por sua vez, apresentou maior intensidade de absorbância na região de lipídios do que hifas do tratamento com luz média, D-M (Fig. 4.12 b).

Na faixa característica pela presença de compostos como bases nitrogenadas, entre 1730 e 1700 cm^{-1} , houve a formação de picos bem delimitados principalmente nos tratamentos D-L e D-M (Fig. 4.12 c). Já em relação à região de proteínas (1700 a 1500 cm^{-1}), o espectro de hifas D-M apresentou intensa área de absorção, o que não foi observado nos demais espectros, uma vez que nestes foi possível notar dois picos bem delimitados correspondentes às regiões de amida I e amida II, no qual no pico de amida II observou-se baixa intensidade de absorbância (Fig. 4.12 c).

Nos espectros de hifas de *R. irregularis* DAOM197198, nos três tratamentos de luz, foi observada a formação de um ombro da região de 1375 cm^{-1} , que está relacionado à presença de quitina em fungos. Hifas do tratamento D-F apresentaram menor intensidade de absorbância nessa região da quitina em relação às hifas dos outros dois tratamentos de luz, D-L e D-M (Fig. 4.12 c). Foi observado também no espectro de absorção FTIR das hifas dos três tratamentos de luz a formação de ombros referentes à presença de polifosfato (polyP), na faixa de 1270–1230 cm^{-1} (Shapaval et al., 2023).

Na região dos carboidratos, entre 1200 cm^{-1} e 950 cm^{-1} , os espectros de hifas sob os três tratamentos de luz, D-F, D-M e D-L, apresentaram picos bastante similares (Fig. 4.12 c). Assim como para a região da quitina, em hifas D-F também foi possível notar menor intensidade de absorbância nas regiões de polyP e carboidratos em comparação com hifas D-M e D-L (Fig. 4.12 c).

Tabela 4.1 Principais picos observados nas hifas extrarradiculares (HE) analisadas. Modos vibracionais: ν , alongamento, ν_s , alongamento simétrico, ν_{as} , alongamento assimétrico, δ , flexão e, ω , oscilação.

Principais picos das HE	Número de onda (cm^{-1})	Modos vibracionais	Compostos relacionados
910–920	910–920	Deformação de C-H, ν ligação fosfodiéster	Carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos
1020–1040	1020–1050	$\nu\text{C-O-C}$, $\nu\text{C-O}$, $\delta\text{C-O}$ do grupo C-OH	Carboidratos incluindo glicose e glicogênio
1100–1120	1100–1125	$\nu_s\text{PO}_4^{2-}$, $\nu_s\text{P-O-C}$, νCO , νCC , $\nu\text{CC ring}$, $\nu\text{C-O}$ do grupo C-OH, ν_s ligação fosfodiéster	Compostos fosfatados, polissacarídeos, ribose, resíduos de sacarídeos fosforilados
1150–1160	1150–1160	ν_s ligação fosfodiéster, deformação de C-O-H, $\nu\text{C-OH}$, $\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-O}$	Compostos fosfatados, glicogênio e proteínas
1230–1270	1210–1280	$\nu_{as}\text{PO}_4^{2-}$, $\nu_{as}\text{PO}_4^{3-}$	PolyP, ácidos nucleicos e fosfolipídios de membrana
1315	1310–1315	Deformação de CH_2 , $\delta\text{-OH}$	Amida III (proteínas)
1370–1375	1375	δCH_2 , $\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-O}$, deformação de C-H e N-H	Polissacarídeos, incluindo quitina
1400–1430	1410–1445	Deformação de C-H, N-H, $\nu\text{C-N}$, $\nu_s\text{COO}^-$, δCH_2	Lipídios e polissacarídeos, incluindo anel de piranose
1500–1580	1600–1500	$\delta\text{N-H}$, $\nu\text{C-N}$	Amida II (proteínas)
1600–1680	1600–1700	$\nu\text{C=O}$, C-N e $\delta\text{N-H}$	Amida I (proteínas transmembrana)
1700–1730	1698–1745	$\nu\text{C=O}$, $\nu\text{C}_2=\text{O}$, $\nu\text{N-H}$	Região das bases nitrogenadas
1750–1760	1745–1750	$\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C})$	Lipídios e polissacarídeos
2700–3000	2800–3000	$\nu_{as}\text{CH}$, $\nu_{as}\text{CH}_2$, $\nu_{as}\text{CH}_3$	Lipídios

Os espectros FTIR de hifas extrarradiculares de *G. intraradices* IAC sob os três tratamentos de luz, G-F, G-M e G-L, apresentaram picos bastante semelhantes na região dos lipídios (Fig. 4.13 a-b). No entanto, ao analisar a intensidade dos picos nesta faixa (3000

a 2700 cm^{-1}), hifas do tratamento de baixa luz, G-L, apresentaram a maior intensidade de absorbância, enquanto G-M apresentou a menor (Fig. 4.13 b). Na região correspondente às bases nitrogenadas (1730 a 1700 cm^{-1}) foram observados picos de intensidades semelhantes nos espectros de hifas dos tratamentos G-F e G-M. No entanto, no tratamento G-L, não houve uma definição clara deste pico, sendo identificada apenas a presença de um ombro nesta região das bases nitrogenadas (Fig. 4.13 c). Os espectros de hifas dos tratamentos G-F, G-M e G-L apresentaram grande similaridade na região de 1700 a 1500 cm^{-1} , correspondente às proteínas, diferenciando-se na intensidade de absorbância dos picos (Fig. 4.13 c). Assim como observado nos espectros anteriores, a região da amida I destaca-se com um pico proeminente e de alta absorbância, enquanto a região da amida II apresenta um pico de menor intensidade e amplitude (Fig. 4.13 c).

Hifas dos tratamentos G-M e G-L apresentaram picos na região correspondente à quitina, em hifas G-L, esse pico se apresentou de forma intensa e bem delimitada, enquanto, em hifas G-M identificou-se nessa região um ombro de baixa intensidade (Fig. 4.13 c). No espectro de hifas G-F, não foi detectada uma ondulação clara na faixa da quitina (Fig. 4.13 c). Em relação à região do polyP, entre 1270 e 1230 cm^{-1} , os espectros de hifas dos tratamentos G-F e G-M exibiram picos característicos desse composto, enquanto em hifas do tratamento G-L não foi observado claramente o padrão característico (Fig. 4.13 c). Na região dos carboidratos, o espectro de hifas do tratamento G-L apresentou o pico de maior intensidade, seguido por hifas do tratamento G-F e, por último, hifas G-M (Fig. 4.13 c).

Foram gerados mapas de imagens hiperespectrais para avaliar a localização dos principais compostos observados nas hifas extrarradiculares. De modo geral, os fragmentos de hifas extrarradiculares sob diferentes tratamentos de luz exibiram padrões similares na localização dos compostos analisados (Fig. 4.14 a-f). Na região dos lipídios (3000 a 2700 cm^{-1}), observou-se evidente variação de intensidade ao longo das hifas analisadas e dependendo do tratamento de luz. A formação de sulcos centrais nas hifas onde a presença de lipídios foi reduzida ou ausente foi especialmente evidente em hifas dos tratamentos D-F, D-L, G-F e G-L (Fig. 4.14 a, c, d, f). Em hifas dos tratamentos D-M e G-M, a distribuição de lipídios seguiu o padrão de variação de intensidade, embora com menor amplitude, resultando em um preenchimento mais homogêneo da região central das hifas (Fig. 4.14 b, e).

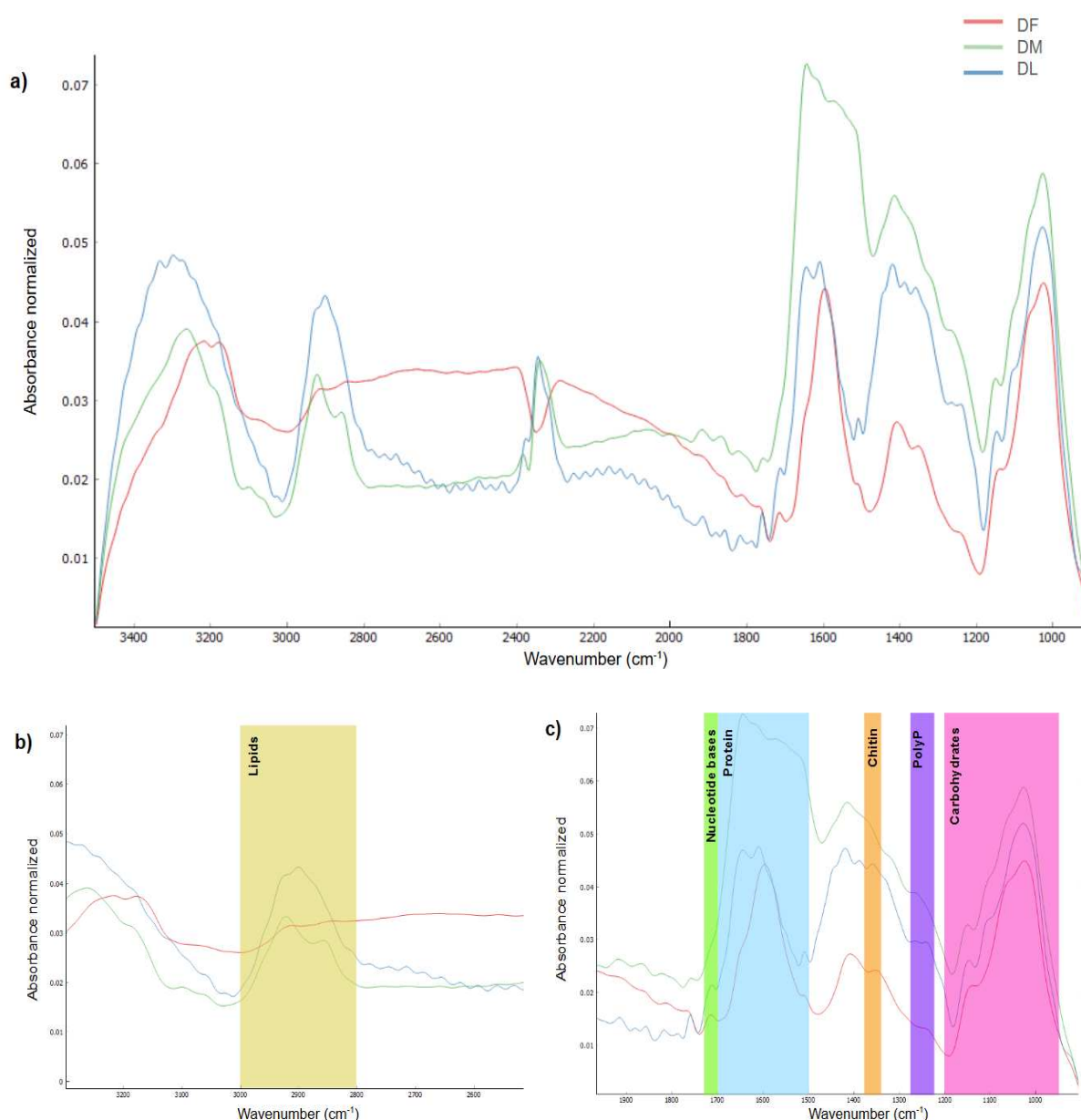


Figura 4.12 Espectros por FTIR de hifas extrarradiculares de *R. irregularis* DAOM197198. Hifas de *R. irregularis* DAOM197198 (D) submetidas aos tratamentos de baixa (L), média (M) e plena (F) intensidade luminosa. Espectro completo (3500 a 950 cm⁻¹) (a) e regiões de compostos de interesse (3400 a 2500 cm⁻¹) (b) e (1900 a 950 cm⁻¹) (c). D-F em vermelho, D-M em verde e D-L em azul. As regiões dos compostos de interesse foram destacadas em amarelo, para lipídios, verde claro, para bases nitrogenadas, azul ciano, para proteínas, alaranjado, para quitina, roxo, para polifosfato (polyP), e rosa, para carboidratos.

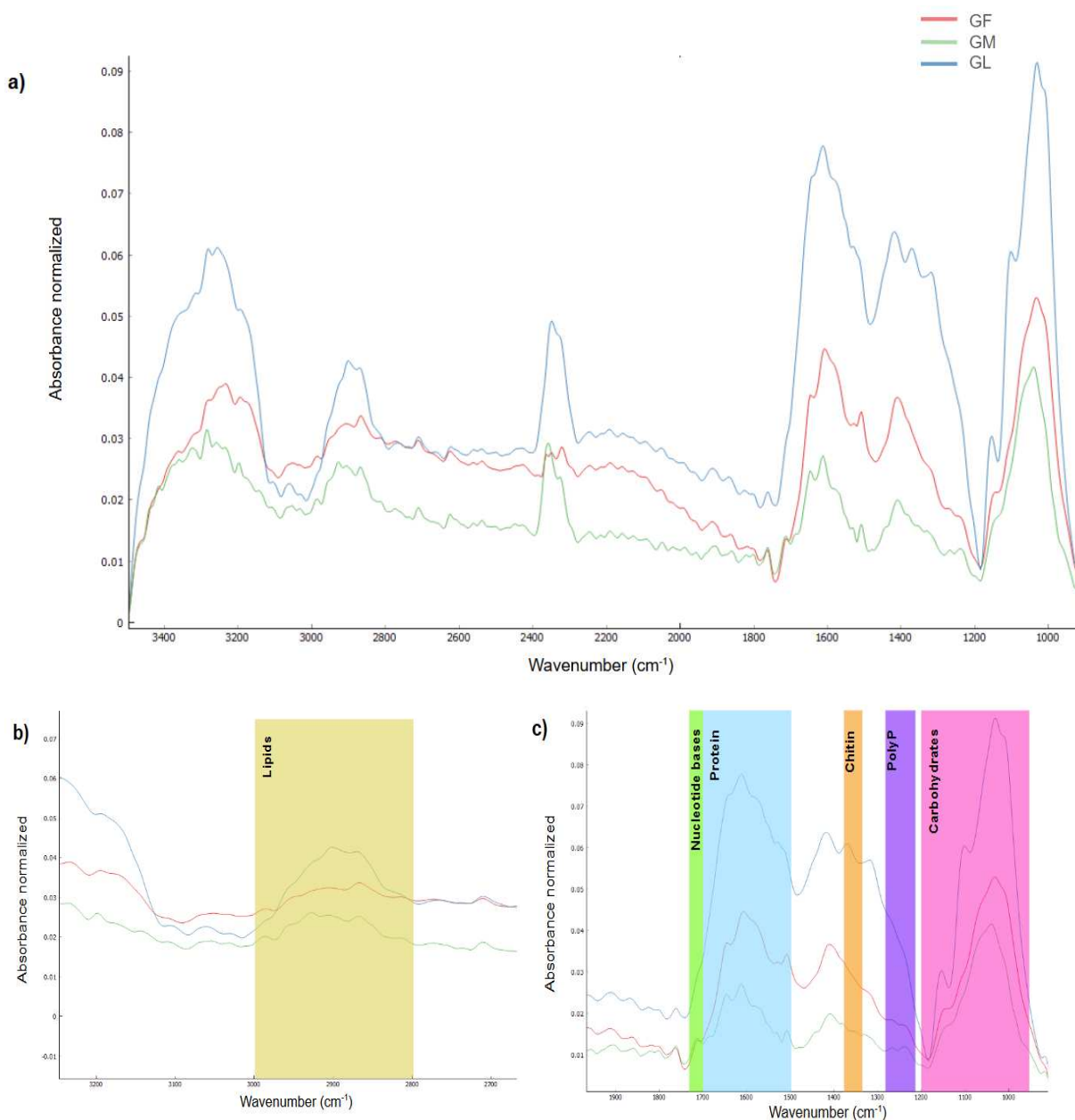


Figura 4.13 Espectros por FTIR de hifas extrarradiculares de *G. intraradices* IAC. Hifas de *G. intraradices* IAC (G) submetidas aos tratamentos de baixa (L), média (M) e plena (F) intensidade luminosa. Espectro completo (3500 a 950 cm⁻¹) (a) e regiões de compostos de interesse (3400 a 2500 cm⁻¹) (b) e (1900 a 950 cm⁻¹) (c). G-F em vermelho, G-M em verde e G-L em azul. As regiões dos compostos de interesse foram destacadas em amarelo, para lipídios, verde claro, para bases nitrogenadas, azul ciano, para proteínas, alaranjado, para quitina, roxo, para polifosfato (polyP), e rosa, para carboidratos.

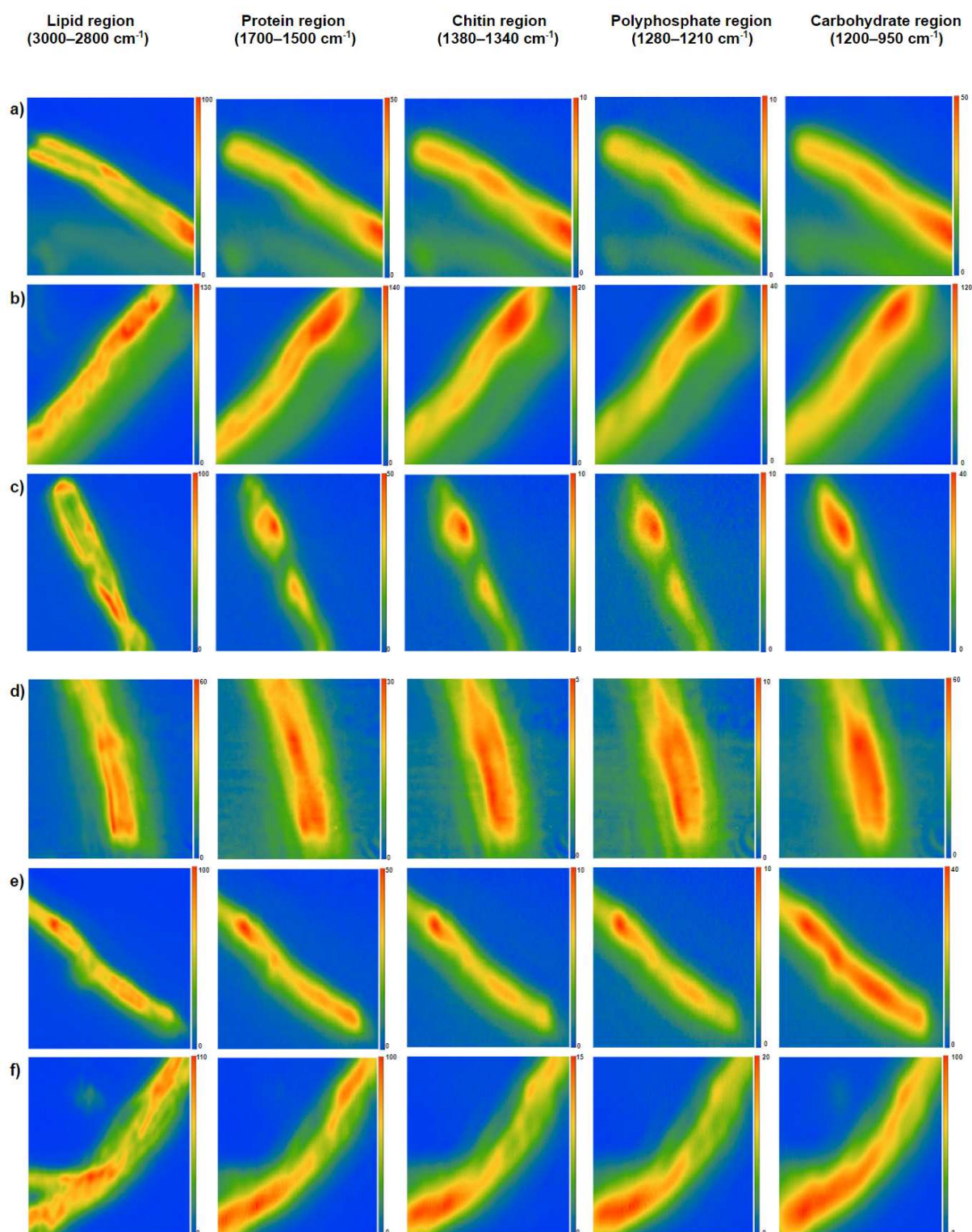


Figura 4.14 Imagens hiperespectrais geradas por FPA-FTIR. Composição e localização celular das regiões do espectro referentes à lipídios, proteínas, quitina, polifosfato (polyP) e carboidratos na porção terminal de fragmentos de hifas dos tratamentos D-F (a), D-M (b), D-L (c), G-F (d), G-M (e) e G-L (f). Barras ao lado de cada quadro indicam a escala de intensidades de absorbância nos mapas hiperespectrais, sendo alta intensidade em vermelho e baixa em azul.

A localização da região de proteínas, $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ocorreu predominantemente em áreas das hifas não preenchidas por lipídios, apresentando menor variação de intensidade do que observado para os lipídios (Fig. 4.14). Houve maior concentração de proteínas na região central das hifas, principalmente nas áreas onde a presença de lipídios era reduzida, mostrando localização diferencial de proteínas e lipídeos (Fig. 4.14 a-f). Para a região espectral atribuída à quitina ($1375\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$) observou-se um padrão de distribuição mais homogêneo do que o observado para proteínas (Fig. 4.14 a-f). Em hifas do tratamento D-F, a quitina apresentou-se ao longo de todo o comprimento da hifa com variações pequenas de intensidade (Fig. 4.14 a).

De forma geral, a distribuição de quitina seguiu o padrão das proteínas, assim como o observado para a localização de polyP (Fig. 4.14 a-f). Neste caso, o polyP mostrou maior intensidade na região central das hifas, apresentando áreas arredondadas de alta intensidade que podem estar associadas a regiões de maior densidade deste tipo de composto (Fig. 4.14 a-f). Na faixa referente aos carboidratos ($1200\text{ a }950\text{ cm}^{-1}$), a sua distribuição se estendeu por toda a área analisada das hifas, com maior intensidade nas porções centrais (Fig. 4.14 a-f). Houve pouca variação na intensidade dos carboidratos, resultando em uma localização homogênea ao longo das hifas (Fig. 4.14 a-f). Em hifas do tratamento D-L, a distribuição de carboidratos concentrou-se nas regiões centrais e apicais, sem se estender em intensidade ao longo da hifa, diferenciando-se de hifas dos demais tratamentos (Fig. 4.14 c)

4.4 Discussão

4.4.1 Pigmentos foliares e atividade fotossintética em plantas micorrizadas sob sombreamento

A associação micorrízica arbuscular está relacionada a modificações na alocação de recursos da planta hospedeira, o que inclui mudanças no conteúdo de pigmentos foliares (Baslam et al., 2013; Zhu et al., 2014; Bagheri et al., 2019). A micorriza arbuscular também tem sido relacionada à otimização de mecanismos de tolerância ao estresse luminoso (Borkowska, 2006; Ferreyra e Casati, 2021; Nascimento e Tattini, 2022). Neste estudo, plantas de braquiária não micorrizadas apresentaram aumento acentuado do índice de clorofila foliar em condições de luz média e luz baixa em comparação às plantas micorrizadas, mas também em relação às plantas não micorrizadas sob luz plena. Maior conteúdo de clorofilas por unidade de massa em plantas sob luz baixa do que sob luz alta (Boardman 1977) pode estar relacionado com mudanças na ultraestrutura de cloroplastos,

uma vez que sob luz baixa os cloroplastos possuem maior número de tilacóides e alto grau de empilhamento dos grana em comparação à cloroplastos de plantas sob luz alta, e a clorofila está ligada a estes (Lichtenhaler et al., 1981). Em *Camellia sinensis*, a exposição a uma taxa de 90% de sombreamento por duas semanas induziu a expressão de genes relacionados à síntese de clorofila, levando ao aumento do conteúdo de clorofila foliar (Chen et al., 2021). Em plantas sob luz plena a associação micorrízica não influenciou o conteúdo de clorofilas foliares, mas sob luz média e baixa, devido ao aumento do índice de clorofilas de plantas não micorrizadas, as plantas associadas apresentaram índices até 60% menores do que plantas não micorrizadas. Frequentemente plantas micorrizadas apresentam maiores conteúdos de clorofilas devido ao melhor estado nutricional se comparado a plantas não micorrizadas, aumentando a absorção de elementos como P e Mg, por exemplo (Zhu et al., 2014).

Em um estudo com morangueiro, a colonização micorrízica contribuiu para a proteção do aparato fotossintético de plantas sob condição de alta luminosidade (Borkowska, 2006). Sob luz plena foi observado maior índice de flavonóis foliares e de antocianinas do que sob condições de redução da intensidade de luz. Ambos, flavonóis e antocianinas são flavonóides com diferentes propriedades óticas e função na proteção contra a luz UV e com ação antioxidante e que podem formar interações moleculares entre si (Dias et al., 2021). Os flavonóis foliares estão relacionados à proteção contra a radiação UV, à mitigação de danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) e ao processo de sinalização e transporte de auxina (Ferreira e Casati, 2021; Nascimento e Tattini, 2022). Quanto ao maior índice de flavonóis nas plantas micorrizadas sob condição de luz baixa, é possível destacar o papel antioxidante desses compostos e a maior resposta do sistema antioxidante em plantas em simbiose com FMA (Ferreira e Casati, 2021). O índice de antocianinas foi significativamente reduzido nas folhas de braquiária em condições de redução de luz, possivelmente devido à inibição da síntese destes compostos sob baixa intensidade luminosa, uma vez que luz UV-A é necessária para a ativação de enzimas como a PAL (fenilalanina amônia liase) (Albert et al., 2009; Guo et al., 2010; Zhu et al., 2017).

O NBI é um índice calculado pela razão entre clorofilas e flavonóis, desta forma o alto NBI em plantas sob condições de luz reduzida, média e baixa, pode estar relacionado à diminuição da densidade foliar, indicado pela diminuição do LMA das folhas e pelo aumento de clorofila e a redução de flavonóis sob redução da intensidade luminosa.

Em geral, o rendimento quântico efetivo (F_v/F_m) foi maior em folhas de plantas sob condições de luz baixa, mas com redução significativa da eficiência do PSII ($\Phi_{PS II}$) e do *quenching* não-fotoquímico (NPQ). O maior F_v/F_m nas plantas sob condição de luz baixa podem refletir aumento da atividade fotossintética, como uma forma de aclimação à baixa

intensidade energética (Murchie e Lawson, 2013; Jia et al., 2019). Os valores de NPQ mais altos para plantas sob as condições de luz plena e luz média também estão relacionados aos mecanismos naturais da planta de proteção do PSII, uma vez que sob maior incidência de luz também é necessário dissipar maior quantidade de energia (Murchie e Lawson, 2013; Jia et al., 2019). Na condição de luz plena, a colonização por FMAs favoreceu o rendimento quântico da fotossíntese, uma vez que as plantas micorrizadas apresentaram maior Φ PSII em comparação às não micorrizadas. Esse resultado corrobora com outros estudos em que o rendimento quântico da fotossíntese, bem como outros parâmetros associados à melhora nas atividades metabólicas e fotossintéticas das plantas foram aumentados pela colonização por FMA (Vaz e Sharma, 2009; Zhu et al., 2013; Campo et al., 2020; Sarathambal et al., 2024).

4.4.2 Efeitos da associação micorrízica arbuscular na produção de biomassa vegetal e estado nutricional de plantas sob sombreamento

De maneira geral, a produção de biomassa decresceu com o aumento do sombreamento, independentemente do status micorrízico. O sombreamento também causou a diminuição da razão raiz: parte aérea, mostrando alocação de carbono preferencialmente à parte aérea. Redução da produção de matéria seca sob redução da intensidade de luz tem sido observado para diversas espécies de gramíneas tropicais (Eriksen e Whitney, 1981). As plantas possuem alta plasticidade fenotípica para lidar com mudanças ambientais e em condições de baixa luminosidade podem priorizar o aumento da área superficial da parte aérea em detrimento do crescimento radicular (Sims et al., 2012). No entanto, podem ser necessárias alterações morfológicas, uma vez que, por exemplo, sob déficits nutricionais, a produção de biomassa da parte aérea pode ficar comprometida (Sims et al., 2012). Os resultados mostraram que as plantas sob condições de luz baixa e luz média apresentaram maior altura da parte aérea do que plantas sob luz plena. Entretanto também houve o decréscimo da massa foliar por área (LMA) com o sombreamento, o que explica a menor produção de biomassa das plantas sob baixa luminosidade, uma vez que quanto maior o LMA, maior a espessura foliar (Liu et al., 2016). A condição de sombreamento pode acarretar diminuição do LMA, pois as folhas ficam mais finas à medida que aumentam em área na tentativa de captar mais luz, com decréscimo da massa e em consequência da densidade foliar (Sims et al., 2012; Liu et al., 2016; de la Riva et al., 2016).

Independentemente da luminosidade, as plantas micorrizadas tiveram sua produção de perfilhos favorecida em comparação às plantas não micorrizadas. Resultados similares foram observados em trigo cultivado em condições de campo, no qual a micorriza

arbuscular aumentou significativamente o perfilhamento e consequentemente sua produtividade (Akbar et al., 2014). O aumento da produção de biomassa vegetal favorecido pela colonização por FMA já é bem conhecido (Smith e Read 2008; Kaschuk et al., 2009; Zhu et al., 2013). Sob luz plena e luz média, plantas micorrizadas apresentaram maior produção de biomassa da parte aérea e maior produção de biomassa de raiz em comparação às plantas não micorrizadas.

A concentração de N na parte aérea das plantas se manteve entre 22 e 24 g kg⁻¹, considerado levemente superior ao adequado para *U. decumbens* que é dentre 12 e 20 g kg⁻¹ de N (Raij et al. 2022). Já a concentração de P na parte aérea teve uma variação maior em plantas sob diferentes regimes de luz, com concentrações entre 0,5 e 1,6 g kg⁻¹, indicando que em plantas sob luz plena e média o P estava abaixo do adequado (0,8 a 3,0 g kg⁻¹), principalmente em plantas não micorrizadas (Raij et al., 2022). No caso do K, os teores adequados se encontram entre 12 e 25 g kg⁻¹, sugerindo que neste estudo as plantas sob regime de luz plena apresentaram teores adequados enquanto plantas sob luz média e alta apresentaram teores acima do adequado indicando efeitos de concentração deste nutriente. Sob luz plena, o conteúdo de N foi favorecido pela presença do FMA, enquanto no tratamento de luz baixa, houve decréscimo significativo do conteúdo de N. Independentemente da micorrização, a redução da luminosidade diminuiu o conteúdo de N da parte aérea, mas não a sua concentração, sugerindo que plantas sob redução de luminosidade reduzem a absorção e acúmulo por unidade de massa produzida. Já, a micorrização aumentou o conteúdo de N apenas sob condições de luz plena, mas não influenciou a concentração de N, indicando maior absorção e acúmulo de N em plantas micorrizadas. A associação com FMAs tem sido relacionada com o aumento do conteúdo de N em plantas, que pode ser absorvido pela via micorrízica (Bücking e Kafle, 2015). Também foi observado que a colonização micorrízica favoreceu o aumento do conteúdo de K sob luz plena e luz média. Apesar de menos relatado na literatura, a associação micorrízica também contribui para a aquisição de K pelas plantas (Scheloske et al., 2004; Perner et al., 2007; Baslam et al., 2013; Garcia e Zimmermann, 2014). Além do aumento do conteúdo de K, a micorrização está relacionada ao aumento nos níveis de expressão de genes associados à canais de K⁺ nas raízes e com a translocação e acúmulo deste elemento na parte aérea, contribuindo para a tolerância ao estresse hídrico, por exemplo (Zhang et al., 2017).

A redução da intensidade luminosa no mais baixo nível aumentou a concentração de P, mas não influenciou o conteúdo de P na parte aérea das plantas. Esses resultados podem indicar que sob sombreamento mais intenso houve variação da concentração de P devido à redução da produção de biomassa. A absorção de P, independentemente do regime de luz, foi maior em plantas associadas aos FMA, que

apresentaram maior conteúdo de P em comparação às plantas não micorrizadas. A colonização por FMA pode favorecer a absorção de P pelas plantas, especialmente em ambientes com baixos níveis de P (Smith et al., 2004; Smith et al., 2011; Lafranco et al., 2018; Qi et al., 2022). É interessante notar que neste estudo a concentração de P na parte aérea foi maior sob baixa intensidade de luz, e somente neste caso, plantas associadas ao FMA tiveram maiores concentrações de P, mostrando, primeiro o efeito de concentração de P em plantas com biomassa menor sob baixa intensidade luminosa e, segundo que a simbiose micorrízica arbuscular manteve-se efetiva na transferência de P mesmo sob condições de baixa luminosidade.

O sombreamento acarretou perda de efeitos benéficos da colonização por FMA, especialmente em relação à promoção de produção de biomassa vegetal. A demanda de carboidratos pelo FMA, associada ao estresse da diminuição da intensidade de luz, pode ter levado as plantas a utilizarem seus recursos de reserva. A relação planta-FMA pode tender ao desequilíbrio quando recursos essenciais à sobrevivência de ambos os indivíduos se tornam escassos. Em situação de estresse por seca e deficiência de nutrientes, por exemplo, a colonização por FMA afetou negativamente o crescimento vegetal de *Artemisia ordosica*, causando a supressão da absorção direta de água e nutrientes pela planta mesmo em baixos níveis de colonização (Wang et al., 2023).

4.4.3 Alterações na alocação de carboidratos no hospedeiro vegetal durante o sombreamento

Sob luz plena as plantas colonizadas por FMAs apresentaram maior concentração de glicose na parte aérea do que plantas não micorrizadas. Mas sob sombreamento, plantas colonizadas por *G. intraradices* IAC apresentaram maior concentração de glicose na parte aérea do que plantas colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198 e não micorrizadas. Em relação à concentração de sacarose na parte aérea, não houve diferenças devido ao status micorrízico. A concentração de amido na parte aérea para as plantas colonizadas por *G. intraradices* IAC foi significativamente maior do que a observada em plantas colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198 e não micorrizadas.

Essas diferenças no conteúdo de carboidratos na parte aérea da planta refletem diferenças entre o efeito de isolados de FMA na fisiologia da planta, possivelmente devido às demandas de carbono pelo FMA e/ou aos processos de troca entre os parceiros simbióticos. *G. intraradices* IAC favoreceu o acúmulo de amido na parte aérea das plantas de *U. decumbens* sob luz plena, além de levar ao maior acúmulo de glicose. Isso pode indicar maior eficiência no processo de assimilação de carbono de plantas colonizadas por

G. intraradices IAC devido à maior força drenante imposta por este isolado (Salmeron-Santiago et al., 2023; Wang e Wu, 2023). Sob luz plena e luz média, raízes de plantas colonizadas pelos FMA apresentaram maior concentração de glicose em comparação às plantas não micorrizadas, mas sob luz baixa, as raízes colonizadas por *G. intraradices* IAC apresentaram maior concentração de glicose do que raízes colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198 e não micorrizadas.

Quanto à sacarose nas raízes, as plantas em G-F apresentaram menor concentração em comparação às plantas em D-F e N-F. Nos tratamentos sob luz média, tais valores foram ligeiramente inferiores para as plantas em D-M, enquanto sob luz baixa ambos os grupos colonizados pelos FMA apresentaram valores maiores em comparação ao grupo não micorrizado. Se tratando da concentração de amido nas raízes, plantas colonizadas pelo inóculo *R. irregularis* DAOM197198 sob luz plena, D-F, apresentaram os maiores valores em comparação aos demais grupos na mesma condição de luminosidade, N-F e G-F. De maneira geral, os resultados podem indicar que sob luz plena, ambos os isolados causaram respostas similares na planta hospedeira em relação às concentrações de sacarose nas raízes. Ainda assim, sob luz plena foi possível notar menor concentração de sacarose em raízes colonizadas por *G. intraradices* IAC, G-F, o que pode caracterizar o estabelecimento de um dreno deste açúcar favorecido por seu potencial químico. Já sob luz média, a mesma situação pode ser observada em raízes de plantas colonizadas pelo isolado *R. irregularis* DAOM197198.

É interessante ressaltar que sob luz baixa, os níveis de glicose se mantiveram maiores nas raízes de plantas colonizadas por *G. intraradices* IAC, sugerindo que o estresse por baixa luminosidade acarreta maior demanda de *G. intraradices* IAC por carboidratos de seu hospedeiro, *U. decumbens*, em comparação ao isolado *R. irregularis* DAOM197198. Há possibilidade de que a planta hospedeira forneça maior quantidade de carboidratos ao FMA *G. intraradices* IAC, como uma forma de manutenção e preservação desta simbiose durante o estresse, uma vez que o hospedeiro pode privilegiar espécies de FMA sobre outras, dependendo da capacidade do FMA de transferir P para a planta ou de outros fatores.

Sob luz plena e baixa as raízes de plantas micorrizadas, independentemente do isolado, mantiveram maior concentração de proteínas solúveis totais do que plantas não micorrizadas. Sob luz média, as raízes colonizadas por *G. intraradices* IAC apresentaram maior concentração de proteínas solúveis totais dentre as outras condições de micorrização. Somente a atividade da invertase alcalina nas raízes de *U. decumbens* colonizadas por *G. intraradices* IAC foi reduzida sob luz baixa.

Os benefícios que a simbiose com FMA traz às plantas estão muito relacionados às espécies de planta e FMA envolvidas na associação (Klironomos et al., 2004; Jansa et

al., 2008; Marro et al., 2022). Propriedades intrínsecas de cada espécie de FMA, como taxa de crescimento, intensidade da produção de estruturas intra e extrarradiculares e fatores associados à sua interação com o ambiente, como estratégias regenerativas e até mesmo sua microbiota associada, são alguns dos principais aspectos associados ao fungo que podem influenciar na manutenção dos efeitos positivos da simbiose para a planta (Maherali e Klironomos, 2007; Chagnon 2013; Marro et al., 2022; Lahrach et al., 2024). Tais características são consequência de vias metabólicas bem conservadas ao longo da evolução da interação entre planta-FMA (Hoeksema et al., 2018; Marro et al., 2022). Em uma meta-análise no nível global sobre os benefícios de diferentes espécies de FMA foi observado que espécies pertencentes à ordem Gigasporales conferiram mais benefícios para plantas não submetidas a situações de estresse, os FMA da ordem Diversisporales foram mais efetivos para plantas em situação de estresse abiótico e os da ordem Glomerales em situações de estresse biótico (Marro et al., 2022).

Neste estudo, ambos os isolados são muito possivelmente pertencentes à mesma espécie, uma vez que *G. intraradices* é sinônimo de *R. irregularis*. No entanto, os isolados possuem diferentes origens e causaram respostas diferentes em associação com *U. decumbens* e ao regime de luz. A interação planta-FMA pode variar quanto aos efeitos para o hospedeiro vegetal, podendo esses serem positivos, neutros ou mesmo negativos (Johnson, 2010; Jin et al., 2017; Pankova et al., 2018; Harrower e Gilbert, 2021). Além de mudanças ambientais e condições de estresse, a identidade do hospedeiro vegetal pode acarretar variações nos efeitos da simbiose, em que, por exemplo, uma mesma espécie de FMA pode provocar respostas diferentes em espécies distintas de plantas e vice-versa (Pankova et al., 2018; Neuenkamp et al., 2019; Bennett e Groten, 2022; Guo et al., 2022). Sendo assim, quando os custos para a manutenção da simbiose planta-FMA ultrapassam os benefícios trazidos à planta, a relação, antes mutualista, assume características de parasitismo (Johnson, 2010).

O aumento na eficiência fotossintética ocasionado pela presença do FMA pode causar maior direcionamento do fluxo de fotoassimilados para as raízes e, consequentemente, para os arbúsculos (Bago et al., 2000). Ao absorverem carboidratos preferencialmente na forma de hexoses, os FMA estimulam a atividade INV ácida nas raízes, que hidrolisam a sacarose nas suas hexoses glicose e frutose, levando a mudanças metabólicas na planta, que envolvem o aumento da taxa de respiração celular na região cortical das raízes (Bago et al., 2000). As diferentes INV são caracterizadas pelo pH ideal de sua atividade e por sua localização a nível celular. Dessa forma, a INV alcalina se encontra no citoplasma e a ácida nos vacúolos, mas também há outro grupo de INV ácidas que estão

ligadas à parede celular, no espaço apoplástico, em uma posição extracelular (Sturm, 1999; Roitsch e González, 2004; Schaarschmidt et al., 2006).

Em plantas de tomateiro colonizadas por FMA, houve aumento da expressão do gene associado à transcrição da INV apoplástica em comparação às plantas não micorrizadas (Schaarschmidt et al., 2006). Os autores ainda relataram problemas para diferenciar a atividade das diferentes INV através de ensaios bioquímicos, sugerindo o uso de técnicas mais sensíveis, como a utilização de marcadores genéticos, para a detecção da atividade de enzimas e compostos envolvidos no metabolismo e transporte de carboidratos durante a simbiose planta-FMA (Schaarschmidt et al., 2006). No mesmo estudo, ainda houve a diferenciação da expressão do gene associado à transcrição da INV apoplástica na raiz vegetal em duas ocasiões distintas, quando em associação com o FMA e quando em situação de estresse por injúria mecânica (Schaarschmidt et al., 2006). Os autores relataram que a injúria mecânica causou o aumento da expressão desse gene em níveis muito superiores aos induzidos pela colonização micorrízica, demonstrando que o controle responsável pela transferência de hexoses para o FMA é extremamente regulado e específico (Schaarschmidt et al., 2006). O mesmo estudo ainda sugere que a atividade da INV ácida vacuolar esteja associada ao início da micorrização, enquanto a INV alcalina atua de maneira mais constante no metabolismo vegetal, já a INV ácida apoplástica estaria envolvida na manutenção da simbiose a longo prazo (Schaarschmidt et al., 2006).

4.4.4 Respostas do parceiro fúngico em situação de estresse por sombreamento da planta hospedeira

Sob luz plena, ambos os isolados de FMAs colonizaram extensão similar das raízes de *U. decumbens*, com taxas de F (%) e M (%) significativamente iguais. Já sob luz baixa, o M (%) e F (%) em raízes colonizadas por *G. intraradices* IAC foi menor do que em raízes colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198. É interessante notar que sob luz plena raízes colonizadas pelo isolado *G. intraradices* IAC tiveram maior quantidade de arbúsculos e vesículas que as colonizadas por *R. irregularis* DAOM197198. Entretanto, sob luz baixa raízes colonizadas pelo isolado *R. irregularis* DAOM197198 apresentaram maior quantidade de arbúsculos e vesículas do que raízes colonizadas pelo *G. intraradices* IAC. A extensão de micélio extrarradicular não foi influenciada pelo regime de luz.

De forma ampla, a redução da intensidade luminosa não causou impacto significativo da colonização extrarradicular, mas a colonização intrarradicular foi altamente influenciada pelo sombreamento, principalmente sob luz baixa. Mesmo sob condições de estresse, as plantas podem preservar a colonização intrarradicular por FMA como uma

forma de investimento a longo prazo, no qual se considera a alta adaptabilidade das plantas às variações ambientais (Walder e van der Heijden, 2015; Konvalinková e Jansa, 2016). Além disso, não foi observada diminuição significativa da concentração de P em plantas micorrizadas, mostrando que a simbiose se manteve funcional na absorção e transferência de P para o hospedeiro.

O efeito de ambos os isolados de FMAs sobre o crescimento vegetal sob condições de sombreamento foram neutros ou positivos, mas não negativos, mostrando que mesmo sob condições em que houve redução da fotossíntese, o FMA promoveu a formação de perfilhos, por exemplo e não causou redução de biomassa como custo da manutenção do fungo. O mesmo também pode ser observado para os conteúdos de N e K da parte aérea, que foram maiores na presença de FMA sob luz plena, mas se mantiveram equiparáveis aos das plantas não micorrizadas sob luz baixa. Isso pode evidenciar que sob condições de sombreamento, em *U. decumbens*, a presença dos FMAs acarretou efeitos que variaram de positivos a neutros, mas não negativos.

Quanto aos efeitos do sombreamento para os FMAs, é interessante pontuar a forte diminuição de arbúsculos e vesículas. Esses resultados corroboram com observações realizadas por outros autores (Konvalinková e Jansa, 2016). Há relatos de menor incidência de arbúsculos de *G. mossae* em raízes de alho-poró em condição de sombreamento (Pearson et al., 1991). Também foi reportada diminuição de vesículas de *R. irregularis* na região cortical das raízes de plantas de alface submetidas à redução de luminosidade (de la Hoz et al., 2021). Outras situações de estresse por metais pesados, alta salinidade ou alterações de pH também causaram a diminuição da abundância de arbúsculos e/ou vesículas (Lin et al., 2007; Krishnamoorthy et al., 2014; Zhang et al., 2020; Feng et al., 2020). Além disso, em exposição à condição de baixo pH, a abundância de arbúsculos foi reduzida em até 4 vezes mais em comparação à diminuição da intensidade micorrízica, mostrando como essas estruturas são mais prejudicadas em ocasiões de estresse (Liu et al., 2020).

Quanto ao perfil composicional analisado por μ -FTIR, foi possível caracterizar as hifas de cada isolado de FMA e sua resposta à luminosidade. Apesar das notáveis semelhanças entre os principais picos nas faixas espectrais referentes às principais biomoléculas, cada isolado de FMA apresentou conformações espectrais únicas. Os FMA possuem características genéticas muito exclusivas de cada espécie, que podem inclusive variar bruscamente entre diferentes cepas na mesma espécie (Oliveira et al., 2024). Em *R. irregularis*, por exemplo, foi observado que cepas distintas podem se diferenciar entre si em até 50% de seu repertório genético, o que explica a ocorrência de propriedades tão particulares para cada isolado distinto de FMA (Oliveira et al., 2024).

A partir das análises por μ -FTIR também foi possível notar, em *R. irregularis* DAOM197198 sob luz plena, D-F, menor intensidade do pico relacionado aos lipídios. Já para o tratamento *G. intraradices* IAC sob luz baixa, G-L, houve maior intensidade de absorvância na faixa de lipídios e o mesmo ocorreu para as faixas referentes à quitina e carboidratos. Quanto à distribuição dos compostos nas hifas extrarradiculares, as proteínas ocuparam regiões opostas às ocupadas por lipídios. Nas hifas de plantas expostas à luz baixa foi possível perceber uma distribuição de carboidratos concentrada nas regiões centrais e apicais da hifa. Já para as demais condições de luminosidade, a distribuição de carboidratos ocorreu de maneira mais uniforme e contínua ao longo das hifas.

a)

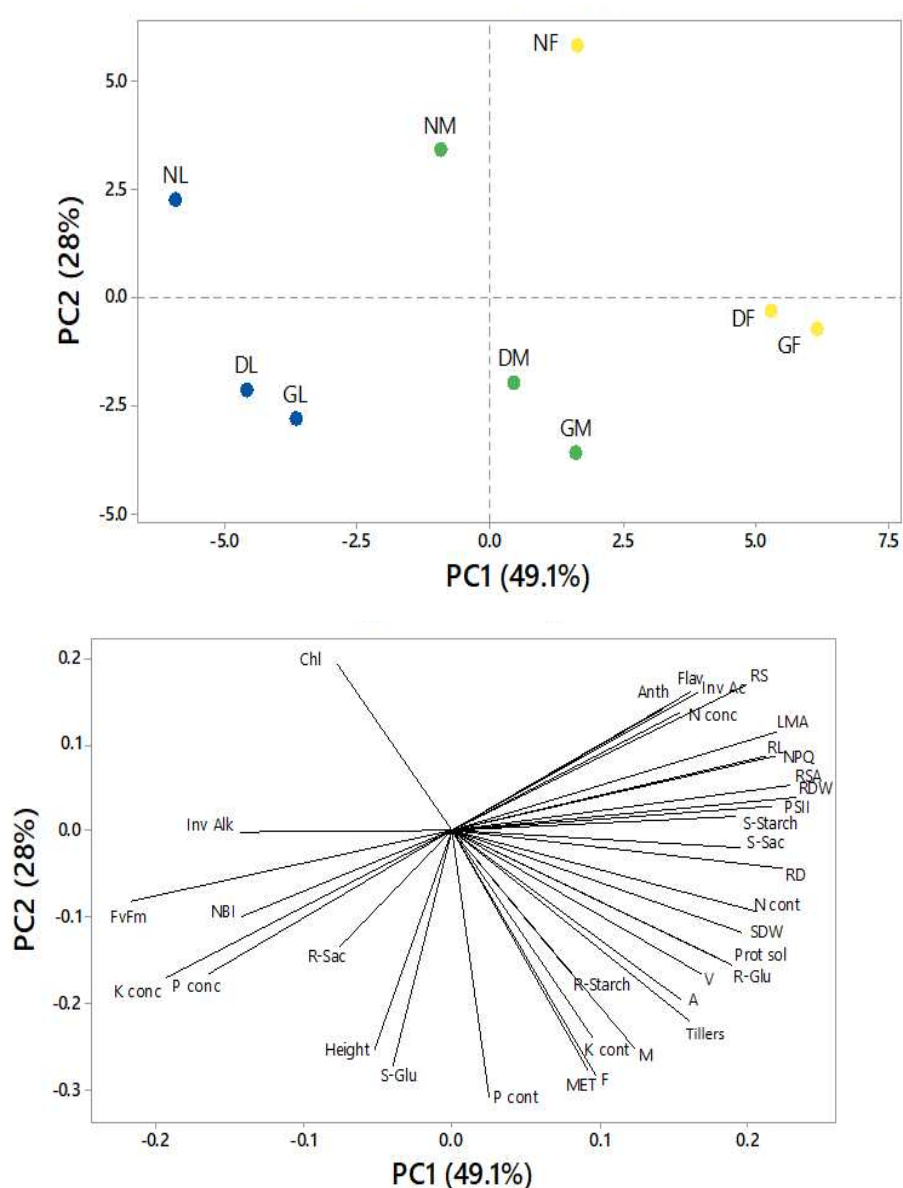


Figura 4.15 Análise de componentes principais entre os tratamentos e variáveis avaliadas, realizada a partir da matriz de correlação de médias dos mínimos quadrados de acessos médios. Entre parênteses a variação Gráfico de escores e b) gráfico de carga obtidos para a distribuição resultante dos tratamentos e das variáveis avaliadas. As cores dos símbolos indicam os tratamentos de luz: azul, luz baixa (L); verde, luz média (M) e amarelo, luz plena (F) para os tratamentos de inoculação: R. irregularis DAOM197198 (D) ou G. intraradices IAC (G) e sem inoculação (N). Abreviações: rendimento quântico efetivo de PSII (Φ PSII), eficiência quântica máxima de PSII (Fv/Fm), antocianina (Anth), clorofila total (Chl), flavonoides (Flav), índice de balanço de nitrogênio (NBI), altura (Height), perfilhos (Tillers), massa seca da parte aérea (SDW), massa seca da raiz (RDW), diâmetro da raiz (RD), comprimento da raiz (RL), área superficial da raiz (RSA), razão raiz: parte aérea (RS), massa foliar por área (LMA), frequência da colonização micorrízica (F), intensidade da colonização micorrízica (M), abundância de arbúsculos (A), abundância de vesículas (V), comprimento do micélio externo total (MET), atividade da invertase ácida (Inv Ac), atividade da invertase alcalina (Inv Alk), proteínas solúveis totais (Prot sol), concentração de N (N conc), concentração de P (P conc), concentração de K (K conc), conteúdo de N (N cont), conteúdo de P (P cont), conteúdo de K (K cont), glicose da parte aérea (S-Glu), sacarose da parte aérea (S-Sac), amido da parte aérea (S-Starch), glicose da raiz (R-Glu), sacarose da raiz (R-Sac), amido de raiz (R-Starch).

A constituição bioquímica dos FMAs apresenta grande quantidade de lipídios, o que inclui fosfolipídios, presentes em suas membranas celulares e lipídios neutros, que fazem parte das estruturas de armazenamento, como vesículas e esporos (Feng et al., 2020). Além da transferência direta de lipídios da planta hospedeira para o FMA, as hifas extrarradiculares possuem a capacidade de absorver lipídios presentes no solo (Feng et al., 2020). Os lipídios também se movem pelas hifas através de gotículas lipídicas, que são transferidas de hifas intrarradiculares para o micélio extrarradicular (Feng et al., 2020). As mudanças estruturais que ocorrem no micélio intrarradicular, como o colapso de arbúsculos e vesículas, refletem diretamente na composição do micélio externo (Feng et al., 2020). Assim, os lipídios antes presentes nas estruturas de colonização intrarradicular, podem se mover em direção às hifas extrarradiculares (Feng et al., 2020).

A partir das correlações de Pearson entre algumas das variáveis, é possível compreender melhor as principais respostas observadas (Tabela 4.2). Os parâmetros de biomassa vegetal, massa seca da parte aérea e comprimento das raízes, se relacionam positiva e fortemente com o parâmetro Φ PSII (Tabela 4.2). O mesmo ocorre para o conteúdo de N da parte aérea, que está fortemente correlacionado, de forma positiva, com os parâmetros de biomassa vegetal (Tabela 4.2). O parâmetro de Fv/Fm, por sua vez, apresentou correlação fortemente negativa com os parâmetros de biomassa vegetal (Tabela 4.2). O conteúdo de P se correlacionou fortemente com a concentração de glicose da parte aérea e também com as variáveis associadas à colonização micorrízica, como F (%), M (%) e MET (Tabela 4.2). A concentração de sacarose da parte aérea se correlacionou positivamente com a V (%) e a glicose nas raízes se correlacionou fortemente, de maneira positiva, aos parâmetros de M (%), A (%) e V (%) (Tabela 4.2).

Também é interessante ressaltar, que apesar de não terem sido observadas grandes variações nos dados associados ao comprimento de MET para os diferentes

tratamentos de luz, ao analisar as correlações de Pearson, foi possível notar forte correlação positiva do MET com as variáveis de colonização intrarradicar, como F (%), M (%) e A (%) (Tabela 4.2). Além disso, as análises de componentes principais (PCA) reforçaram a confiabilidade dos dados. Enquanto para os tratamentos não micorrizados foi possível perceber semelhanças, o mesmo ocorreu para ambos os tratamentos inoculados por FMA (Fig. 4.15). Além disso, também foi possível agrupar algumas das variáveis fortemente correlacionadas, como por exemplo MET, F (%), M (%), amido das raízes e os conteúdos de P e K da parte aérea (Fig. 4.15). Bem como, A (%), V (%), número de perfilhos, glicose das raízes, proteínas solúveis totais nas raízes, massa seca das raízes e conteúdo de N da parte aérea (Fig. 4.15). Esses dados em conjunto corroboram com as principais hipóteses aqui discutidas.

4.5 Conclusão

A micorrização em ambos os casos favoreceu a absorção de P e o perfilhamento de *U. decumbens* independentemente do estresse por sombreamento. Sob luz plena, o isolado *G. intraradices* IAC demonstrou maior eficiência no acúmulo de carboidratos na parte aérea, enquanto o inóculo *R. irregularis* DAOM197198 favoreceu principalmente o armazenamento de amido nas raízes. Em condições de sombreamento, as respostas evidenciaram como a demanda metabólica e os ajustes fisiológicos de planta e FMA influenciaram na manutenção da simbiose. Apesar da diminuição de arbúsculos e vesículas do FMA sob baixa luminosidade, o fluxo de P do fungo para a planta se manteve contínuo, o que indicou a preservação da relação mutualista entre os simbiontes. Além disso, para o *G. intraradices* IAC o sombreamento não influenciou na concentração de glicose nas raízes, podendo sugerir o favorecimento do vínculo planta-FMA fomentado pela planta ou uma maior eficiência deste isolado de FMA em estimular o fornecimento de glicose pela planta hospedeira. Dessa maneira, o sombreamento da planta hospedeira resultou em diferentes formas de manutenção da simbiose entre os dois isolados. As análises por μ -FTIR também destacaram diferenças entre as hifas extrarradiculares dos inóculos de FMA. Os espectros médios de cada isolado de FMA apresentaram conformações únicas principalmente nas regiões de proteínas e carboidratos. Esses achados reforçam o caráter de especificidade da relação entre planta-FMA durante a associação micorrízica.

5. Referências bibliográficas

- Akbar, N., Ishfaq, M., Iqbal, A., Javed, M. W., Aslam, A., Kaleem, M., ... & Shehzad, M. (2014) Optimization of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Yield Relativities via Varying Levels of Potassium and Planting Geometry.
- Albert, N. W., Lewis, D. H., Zhang, H., Irving, L. J., Jameson, P. E., & Davies, K. M. (2009). Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of experimental botany*, 60(7), 2191-2202.
- Bagheri, V., Shamshiri, M. H., Alaei, H., & Salehi, H. (2019). The role of inoculum identity for growth, photosynthesis, and chlorophyll fluorescence of zinnia plants by arbuscular mycorrhizal fungi under varying water regimes. *Photosynthetica*, 57(2).
- Bago, B., Chamberland, H., Goulet, A., Vierheilig, H., Lafontaine, J. G., & Piché, Y. (1996). Effect of Nikkomycin Z, a chitin-synthase inhibitor, on hyphal growth and cell wall structure of two arbuscular-mycorrhizal fungi. *Protoplasma*, 192, 80-92.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., & Shachar-Hill, Y. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant physiology*, 124(3), 949-958.
- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R. M., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P. J., ... & Shachar-Hill, Y. (2002). Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 128(1), 108-124.
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., ... & Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8), 1771-1791.
- Balestrini, R., & Bonfante, P. (2005). The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: a special type of plant cell wall?. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 139(1), 8-15.
- Balestrini, R., & Bonfante, P. (2014). Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Frontiers in plant science*, 5, 237.

Balzerque, C., Puech-Pagès, V., Bécard, G., & Rochange, S. F. (2011). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1049-1060.

Barboux, R., Boust, F., & Di Martino, P. (2021). FTIR spectroscopy for identification and intra-species characterization of *Serpula lacrymans*. *Applied Sciences*, 11(18), 8463.

Barros, K. A., Esteves-Ferreira, A. A., Inaba, M., Meally, H., Finnan, J., Barth, S., & Sulpice, R. (2020). Transient carbon reserves in barley: malate, sucrose and starch are the main players, their quantitative involvement being light intensity dependant. *Frontiers in Plant Science*, 11, 209.

Baslam, M., Esteban, R., García-Plazaola, J. I., & Goicoechea, N. (2013). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3119-3128.

Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., ... & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 10, 1068.

Beilby, J. P., & Kidby, D. K. (1980). Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar lipids. *Journal of Lipid Research*, 21(6), 739-750.

Bennett, A. E., & Groten, K. (2022). The costs and benefits of plant–arbuscular mycorrhizal fungal interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1), 649-672.

Berta, G., Fusconi, A., & Trotta, A. (1993). VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environmental and Experimental Botany*, 33(1), 159-173.

Boardman, N. T. (1977). Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual review of plant physiology*, 28(1), 355-377.

- Boddington, C. L., Bassett, E. E., Jakobsen, I., & Dodd, J. C. (1999). Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(3), 479-482.
- Bitterlich, M., Franken, P., & Graefe, J. (2019). Atmospheric drought and low light impede mycorrhizal effects on leaf photosynthesis—a glasshouse study on tomato under naturally fluctuating environmental conditions. *Mycorrhiza*, 29(1), 13-28.
- Bonfante-Fasolo, P., & Gripiolo, R. (1984). Cytochemical and biochemical observations on the cell wall of the spore of *Glomus epigaeum*. *Protoplasma*, 123, 140-151.
- Bonfante-Fasolo, P., Faccio, A., Perotto, S., & Schubert, A. (1990). Correlation between chitin distribution and cell wall morphology in the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycological Research*, 94(2), 157-165.
- Bonfante, P., & Genre, A. (2015). Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak 'plantish' or 'fungish'?. *Trends in plant science*, 20(3), 150-154.
- Borkowska, B. (2006). Chlorophyll a fluorescence method as a physiological marker of plant response to light stress and endo-mycorrhiza (AMF). In V International Symposium on Artificial Lighting in Horticulture 711 (pp. 177-182).
- Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bremner, J. M. (1960). Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55(1), 11-33.
- Breuillin, F., Schramm, J., Hajirezaei, M., Ahkami, A., Favre, P., Druege, U., ... & Reinhardt, D. (2010). Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *The Plant Journal*, 64(6), 1002-1017.

- Bücking, H., & Kafle, A. (2015). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. *Agronomy*, 5(4), 587-612.
- Buensanteai, N., Thumanu, K., Kooboran, K., Athinuwat, D., & Prathuangwong, S. (2012). Biochemical adaptation of phytopathogenic fungi, *Sclerotium rolfsii*, in response to temperature stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(84), 15082-15090.
- Campo, S., Martín-Cardoso, H., Olivé, M., Pla, E., Catala-Forner, M., Martínez-Eixarch, M., & San Segundo, B. (2020). Effect of root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi on growth, productivity and blast resistance in rice. *Rice*, 13(1), 42.
- Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C. T., Jedrzejczak, R. P., Joachimiak, A., & Stacey, G. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *elife*, 3, e03766.
- Cha, J. E., & Eom, A. H. (2023). Asymbiotic Spore Production of *Rhizoglyphus intraradices* in a Medium Containing Myristate. *Mycobiology*, 51(3), 164-168.
- Chagnon, P. L., Bradley, R. L., Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2013). A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in plant science*, 18(9), 484-491.
- Chatzistathis, T., Alifragis, D., & Papaioannou, A. (2015). The influence of liming on soil chemical properties and on the alleviation of manganese and copper toxicity in *Juglans regia*, *Robinia pseudoacacia*, *Eucalyptus* sp. and *Populus* sp. plantations. *Journal of Environmental Management*, 150, 149-156.
- Chen, J., Wu, S., Dong, F., Li, J., Zeng, L., Tang, J., & Gu, D. (2021). Mechanism underlying the shading-induced chlorophyll accumulation in tea leaves. *Frontiers in Plant Science*, 12, 779819.
- Chen, W., Cao, P., Liu, Y., Yu, A., Wang, D., Chen, L., ... & Yang, Q. (2022). Structural basis for directional chitin biosynthesis. *Nature*, 610(7931), 402-408.

Chern, E. C., Tsai, D. W., & Ogunseitan, O. A. (2007). Deposition of glomalin-related soil protein and sequestered toxic metals into watersheds. *Environmental Science & Technology*, 41(10), 3566-3572.

Clark, R. Á., & Zeto, S. K. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of plant Nutrition*, 23(7), 867-902.

Cooper, K. M., & Tinker, P. B. (1978). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas: ii. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytologist*, 81(1), 43-52.

Corradi, N., & Lildhar, L. (2012). Meiotic genes in the arbuscular mycorrhizal fungi: What for?. *Communicative & Integrative Biology*, 5(2), 187-189.

G. Cox, K. Moran, F. Sanders, C. Nockolds, P. Tinker. (1980). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytol.* 84, 649–659.

Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Renard, L., Strullu, D. G., & Declerck, S. (2005). Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhizal fungi with root organs. *In vitro culture of mycorrhizas*, 341-375.

Czarnecki, O., Yang, J., Weston, D. J., Tuskan, G. A., & Chen, J. G. (2013). A dual role of strigolactones in phosphate acquisition and utilization in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7681-7701.

Das, D., & Gutjahr, C. (2022). Old dog, new trick: The PHR-SPX system regulates arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Molecular plant*, 15(2), 225-227.

de Andrade, S. A. L., Domingues Jr, A. P., & Mazzafera, P. (2015). Photosynthesis is induced in rice plants that associate with arbuscular mycorrhizal fungi and are grown under arsenate and arsenite stress. *Chemosphere*, 134, 141-149.

de la Hoz, J., Rivero, J., Azcón-Aguilar, C., Urrestarazu, M., & Pozo, M. J. (2021). Mycorrhiza-induced resistance against foliar pathogens is uncoupled of nutritional effects under different light intensities. *Journal of Fungi*, 7(6), 402.

De Oliveira, V. H., Mazzafera, P., & de Andrade, S. A. L. (2022). Alleviation of low phosphorus stress in *Eucalyptus grandis* by arbuscular mycorrhizal symbiosis and excess Mn. *Plant Stress*, 5, 100104.

De Oliveira, V. H., Montanha, G. S., Carvalho, H. W., Mazzafera, P., & de Andrade, S. A. L. (2023). Mycorrhizal symbiosis alleviates Mn toxicity and downregulates Mn transporter genes in *Eucalyptus tereticornis* under contrasting soil phosphorus. *Plant and Soil*, 489(1), 361-383.

De La Riva, E. G., Olmo, M., Poorter, H., Ubers, J. L., & Villar, R. (2016). Leaf mass per area (LMA) and its relationship with leaf structure and anatomy in 34 Mediterranean woody species along a water availability gradient. *PloS one*, 11(2), e0148788.

Degens, B. P., Spading, G. P., & Abbott, L. K. (1996). Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. *Applied Soil Ecology*, 3(95).

Diagne, N., Ngom, M., Djighaly, P. I., Fall, D., Hoher, V., & Svistoonoff, S. (2020). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity*, 12(10), 370.

Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.

Doidy, J. (2012). The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: sugar transport from plant source leaves towards the arbuscular mycorrhizal fungus (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).

Driver, J. D., Holben, W. E., & Rillig, M. C. (2005). Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(1), 101-106.

Dubois, M. K. (1956). Use of phenol reagent for the determination of total sugar. *Anal. Chem.*, 28, 350.

Eriksen, F. I., & Whitney, A. S. (1981). Effects of Light Intensity on Growth of Some Tropical Forage Species. I. Interaction of Light Intensity and Nitrogen Fertilization on Six Forage Grasses 1. *Agronomy journal*, 73(3), 427-433.

Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of botany*, 104(7), 1263-1280.

Ezawa, T. & Saito, K. (2001). Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra-and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 149(3), 555-563.

Ezawa, T., & Saito, K. (2018). How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. *New phytologist*, 220(4), 1116-1121.

Fecht-Christoffers, M. M., Maier, P., Iwasaki, K., Braun, H. P., & Horst, W. J. (2007). The role of the leaf apoplast in manganese toxicity and tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions: The significance of the apoplast for the mineral nutrition of higher plants*, 307-321.

Feng, Z., Liu, X., Zhu, H., & Yao, Q. (2020). Responses of arbuscular mycorrhizal symbiosis to abiotic stress: a lipid-centric perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11, 578919.

Ferreira, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia plantarum*, 173(3), 736-749.

Ferrol, N., González-Guerrero, M., Valderas, A., Benabdellah, K., & Azcón-Aguilar, C. (2009). Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews*, 8, 551-559.

Ferrol, N., Tamayo, E., & Vargas, P. (2016). The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of experimental botany*, erw403.

Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., & Pérez-Tienda, J. (2019). Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved. *Plant Science*, 280, 441-447.

Fese PH, Zuccaro A (2016) Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Curr Opin Microbiol* 32:103–112

Fossalunga, A., & Novero, M. (2019). To trade in the field: the molecular determinants of arbuscular mycorrhiza nutrient exchange. *Chemical and Biological technologies in Agriculture*, 6, 1-12.

Fracchia, S., Krapovickas, L., Aranda-Rickert, A., & Valentinuzzi, V. S. (2011). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes by *Ctenomys* cf. *knighti* (Rodentia) in the northern Monte Desert of Argentina. *Journal of Arid Environments*, 75(11), 1016-1023.

Gallaud, I. (1905). Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev. gén. Bot.*, 17, 479-500.

Garcia, K., & Zimmermann, S. D. (2014). The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 5, 337.

Gaude, N., Schulze, W. X., Franken, P., & Krajinski, F. (2012). Cell type-specific protein and transcription profiles implicate periarbuscular membrane synthesis as an important carbon sink in the mycorrhizal symbiosis. *Plant Signaling & Behavior*, 7(4), 461-464.

Gelderen, K., Kang, C., & Pierik, R. (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant physiology*, 176(2), 1049-1060.

Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving & decanting.

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.

Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citerinesi, A. S., & Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*, 125(3), 587-593.

Goddard, M. L., Belval, L., Martin, I. R., Roth, L., Laloue, H., Deglène-Benbrahim, L., ... & Chong, J. (2021). Arbuscular mycorrhizal symbiosis triggers major changes in primary metabolism together with modification of defense responses and signaling in both roots and leaves of *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 721614.

Gonzalez-Guerrero, M., Melville, L. H., Ferrol, N., Lott, J. N., Azcon-Aguilar, C., & Peterson, R. L. (2008). Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(2), 103-110.

Gow, N. A., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum*, 5(3), 10-1128.

P. Griffiths, Fourier transform infrared spectrometry. *Science*. 222, 297–302 (1983).

Gryndler, M., Larsen, J., Hršelová, H., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Kubát, J. (2006). Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. *Mycorrhiza*, 16(3), 159-166.

Guo, J., & Wang, M. H. (2010). Ultraviolet A-specific induction of anthocyanin biosynthesis and PAL expression in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant growth regulation*, 62, 1-8.

Guo, X., Wang, P., Wang, X., Li, Y., & Ji, B. (2022). Specific plant mycorrhizal responses are linked to mycorrhizal fungal species interactions. *Frontiers in Plant Science*, 13, 930069.

Hamp, R., & Schaeffer, C. (1999). Mycorrhiza—carbohydrate and energy metabolism. In *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 273-303.

Harrower, J. T., & Gilbert, G. S. (2021). Parasitism to mutualism continuum for Joshua trees inoculated with different communities of arbuscular mycorrhizal fungi from a desert elevation gradient. *PloS one*, 16(8), e0256068.

Hawkins, H. J., Cargill, R. I., Van Nuland, M. E., Hagen, S. C., Field, K. J., Sheldrake, M., ... & Kiers, E. T. (2023). Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. *Current Biology*, 33(11), R560-R573.

Hijikata, N., Murase, M., Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M., & Ezawa, T. (2010). Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. In *New Phytologist* (Vol. 186, Issue 2).

Hildebrandt, U., Regvar, M., & Bothe, H. (2007). Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68(1), 139-146.

Hobbie E. A. (2006). Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with below-ground allocation in culture studies. *Ecology* 87: 563–569.

Hoeksema, J. D., Bever, J. D., Chakraborty, S., Chaudhary, V. B., Gardes, M., Gehring, C. A., ... & Zee, P. C. (2018). Evolutionary history of plant hosts and fungal symbionts predicts the strength of mycorrhizal mutualism. *Communications biology*, 1(1), 116.

Howe, P., Malcolm, H., & Dobson, S. (2004). Manganese and its compounds: environmental aspects. World Health Organization.

Huertas, V., Jiménez, A., Diáñez, F., Chelhaoui, R., & Santos, M. (2024). Importance of Dark Septate Endophytes in Agriculture in the Face of Climate Change. *Journal of Fungi*, 10(5), 329.

Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2017). Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 4871-4881.

Instituto Agronômico de Campinas. (2022). Boletim 100: Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. IAC.

- Jansa, J., Smith, F. A., & Smith, S. E. (2008). Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. *New Phytologist*, 177(3), 779-789.
- Jensen, L. T., Ajua-Alemanji, M., & Culotta, V. C. (2003). The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42036-42040.
- Jia, M., Li, D., Colombo, R., Wang, Y., Wang, X., Cheng, T., ... & Zhang, C. (2019). Quantifying chlorophyll fluorescence parameters from hyperspectral reflectance at the leaf scale under various nitrogen treatment regimes in winter wheat. *Remote Sensing*, 11(23), 2838.
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Zhang, X., Yang, C., Chen, X., Tang, D., & Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *In Science* (Vol. 356).
- Jin, L., Wang, Q., Wang, Q., Wang, X., & Gange, A. C. (2017). Mycorrhizal-induced growth depression in plants. *Symbiosis*, 72, 81-88.
- Johnson, N. C. (2010). Resource stoichiometry elucidates the structure and function of arbuscular mycorrhizas across scales. *New Phytologist*, 185(3), 631-647.
- Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *The New Phytologist*, 140(2), 295-310.
- Jury, F., & Thibault-Starzyk, F. (2017). Mechanism of low pressure plasma-assisted CO₂ hydrogenation over Ni-USY by microsecond time-resolved FTIR spectroscopy. *Topics in Catalysis*, 60, 1709-1721.
- Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). Trace elements of group 12 (Previously group IIb). *Trace elements from soil to human*, 283-319.
- Kakouridis, A., Hagen, J. A., Kan, M. P., Mambelli, S., Feldman, L. J., Herman, D. J., ... & Firestone, M. K. (2022). Routes to roots: direct evidence of water transport by arbuscular mycorrhizal fungi to host plants. *New Phytologist*, 236(1), 210-221.

Kalamulla, R., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Galappaththi, M. C., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., ... & Yapa, N. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable agriculture. *Sustainability*, 14(19), 12250.

Kamel, L., Keller-Pearson, M., Roux, C., & Ané, J. M. (2017). Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. *New Phytologist*, 213(2), 531-536.

Kameoka, H., & Gutjahr, C. (2022). Functions of lipids in development and reproduction of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Cell Physiology*, 63(10), 1356-1365.

Kaschuk, G., Kuyper, T. W., Leffelaar, P. A., Hungria, M., & Giller, K. E. (2009). Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses?. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1233-1244.

Keymer, A., Pimprikar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S. L., ... & Gutjahr, C. (2017). Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *elife*, 6, e29107.

Keymer, A., & Gutjahr, C. (2018). Cross-kingdom lipid transfer in arbuscular mycorrhiza symbiosis and beyond. *current opinion in plant biology*, 44, 137-144.

Kikuchi, Y., Hijikata, N., Yokoyama, K., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., ... & Ezawa, T. (2014). Polyphosphate accumulation is driven by transcriptome alterations that lead to near-synchronous and near-equivalent uptake of inorganic cations in an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 204(3), 638-649.

Kikuchi, Y., Hijikata, N., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., ... & Ezawa, T. (2016). Aquaporin-mediated long-distance polyphosphate translocation directed towards the host in arbuscular mycorrhizal symbiosis: application of virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 211(4), 1202-1208.

Klironomos, J. N., McCune, J., & Moutoglou, P. (2004). Species of arbuscular mycorrhizal fungi affect mycorrhizal responses to simulated herbivory. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 133-141.

Kobae, Y., Kawachi, M., Saito, K., Kikuchi, Y., Ezawa, T., Maeshima, M., ... & Fujiwara, T. (2015). Up-regulation of genes involved in N-acetylglucosamine uptake and metabolism

suggests a recycling mode of chitin in intraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 25, 411-417.

Kobae, Y., Ohmori, Y., Saito, C., Yano, K., Ohtomo, R., & Fujiwara, T. (2016). Phosphate treatment strongly inhibits new arbuscule development but not the maintenance of arbuscule in mycorrhizal rice roots. *Plant physiology*, 171(1), 566-579.

Kokkoris, V., Pogiatis, A., & Hart, M. M. (2019). Contrasting common measures of arbuscular mycorrhizal fungal root colonization. *Journal of microbiological methods*, 167, 105727.

Konvalinková, T., & Jansa, J. (2016). Lights off for arbuscular mycorrhiza: on its symbiotic functioning under light deprivation. *Frontiers in Plant Science*, 7, 782.

Konvalinková, T., Püschel, D., Janoušková, M., Gryndler, M., & Jansa, J. (2015). Duration and intensity of shade differentially affects mycorrhizal growth-and phosphorus uptake responses of *Medicago truncatula*. *Frontiers in plant science*, 6, 65.

Konvalinková, T., Püschel, D., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Jansa, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant and Soil*, 419(1–2), 319–333.

Krishnamoorthy, R., Kim, K., Kim, C., & Sa, T. (2014). Changes of arbuscular mycorrhizal traits and community structure with respect to soil salinity in a coastal reclamation land. *Soil Biology and Biochemistry*, 72, 1-10.

Lafranco, L., Fiorilli, V., & Gutjahr, C. (2018). Partner communication and role of nutrients in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. In *New Phytologist*, 220(4), 1031–1046.

Lahrach, Z., Legeay, J., Ahmed, B., & Hijri, M. (2024). The composition of the arbuscular mycorrhizal fungal bacteriome is species dependent. *Environmental Microbiome*, 19(1), 77.

Lambers, H. (2022). Phosphorus acquisition and utilization in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 73(1), 17-42.

Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., ... & Sockalingum, G. D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *International journal of food microbiology*, 168, 32-41.

Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2015). Arbuscular mycorrhizal contribution to copper, manganese and iron nutrient concentrations in crops - A meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 147–158.

Lenoir, I., Fontaine, J., & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry*, 123, 4–15.

Leyva-Morales, R., Gavito, M. E., & Carrillo-Saucedo, S. M. (2018). Morphological and physiological responses of the external mycelium of *Rhizophagus intraradices* to water stress. *Mycorrhiza*, 29(2), 141–147.

Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., & Chen, B. (2014). Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza*, 24(8), 595–602.

Li, H., Santos, F., Butler, K., & Herndon, E. (2021). A Critical Review on the Multiple Roles of Manganese in Stabilizing and Destabilizing Soil Organic Matter. In *Environmental Science and Technology*, 55(18), 12136–12152.

Li, Z., Wu, S., Yi, Q., Liu, Y., Wang, J., Nguyen, T. A. H., Ma, Y., You, F., Chan, T. S., Klein, A., Levett, A., Southam, G., Alessi, D. S., Huang, Y., & Huang, L. (2023). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Drive Organo-Mineral Association in Iron Ore Tailings: Unravelling Microstructure at the Submicron Scale by Synchrotron-Based FTIR and STXM-NEXAFS. *Environmental Science and Technology*, 57(51), 21779–21790.

Liang, Q., & Zhou, B. (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 4741–4749.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D., Rahmsdorf, U. (1981). Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research*, 2, 115-141

- Lin, A. J., Zhang, X. H., Wong, M. H., Ye, Z. H., Lou, L. Q., Wang, Y. S., & Zhu, Y. G. (2007). Increase of multi-metal tolerance of three leguminous plants by arbuscular mycorrhizal fungi colonization. *Environmental Geochemistry and Health*, 29, 473-481.
- Liu, Y., Dawson, W., Prati, D., Haeuser, E., Feng, Y., & van Kleunen, M. (2016). Does greater specific leaf area plasticity help plants to maintain a high performance when shaded?. *Annals of botany*, 118(7), 1329-1336.
- Lopes, J., Correia, M., Martins, I., Henriques, A. G., Delgadillo, I., da Cruz e Silva, O., & Nunes, A. (2016). FTIR and Raman spectroscopy applied to dementia diagnosis through analysis of biological fluids. *Journal of Alzheimer's Disease*, 52(3), 801-812.
- Loutherback, K., Chen, L., & Holman, H. Y. N. (2015). Open-channel microfluidic membrane device for long-term FT-IR spectromicroscopy of live adherent cells. *Analytical chemistry*, 87(9), 4601-4606.
- Loutherback, K., Birarda, G., Chen, L., & N. Holman, H. Y. (2016). Microfluidic approaches to synchrotron radiation-based Fourier transform infrared (SR-FTIR) spectral microscopy of living biosystems. *Protein and Peptide Letters*, 23(3), 273-282.
- Luginbuehl, L. H., Menard, G. N., Kurup, S., van Erp, H., Radhakrishnan, G. v., Breakspear, A., Oldroyd, G. E. D., & Eastmond, P. J. (2017). Fatty acids in arbuscular mycorrhizal fungi are synthesized by the host plant. *Science*, 356(6343), 1175–1178.
- Maherali, H., & Klironomos, J. N. (2007). Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *science*, 316(5832), 1746-1748.
- Malcová, R., Vosátka, M., & Gryndler, M. (2003). Effects of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* L. and *Agrostis capillaris* L. *Applied Soil Ecology*, 23(1), 55–67.
- Mandyam, K. G., & Jumpponen, A. (2015). Mutualism–parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Frontiers in microbiology*, 5, 776.

- Marro, N., Grilli, G., Soteras, F., Caccia, M., Longo, S., Cofré, N., ... & Urcelay, C. (2022). The effects of arbuscular mycorrhizal fungal species and taxonomic groups on stressed and unstressed plants: a global meta-analysis. *New Phytologist*, 235(1), 320-332.
- Mayerhofer, M. S., Kernaghan, G., & Harper, K. A. (2013). The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 23, 119-128.
- McGaley, J., Schneider, B., & Paszkowski, U. (2024). The AMSlide for noninvasive time-lapse imaging of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Microscopy*.
- Melloni, R., & Cardoso, E. J. B. N. (1999). Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas e endófitos: I. Método empregado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 23, 53-58.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., & Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(4), 470-481.
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology advances*, 29(6), 645-653.
- Mou, D., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Tian, C., & Achal, V. (2011). Plant high tolerance to excess manganese related with root growth, manganese distribution and antioxidative enzyme activity in three grape cultivars. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 776-786.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134-179.
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany*, 64(13), 3983-3998.
- Nagaraj, V. J., Riedl, R., Boller, T., Wiemken, A., & Meyer, A. D. (2001). Light and sugar regulation of the barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology*, 158(12), 1601-1607.

Nascimento, L. B. D. S., & Tattini, M. (2022). Beyond photoprotection: The multifarious roles of flavonoids in plant terrestrialization. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5284.

Nelson, N. (1960). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem*, 153(2), 375-380.

Neuenkamp, L., Prober, S. M., Price, J. N., Zobel, M., & Standish, R. J. (2019). Benefits of mycorrhizal inoculation to ecological restoration depend on plant functional type, restoration context and time. *Fungal Ecology*, 40, 140-149.

Newsham, K. K. (2011). A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytologist*, 190(3), 783-793.

Nogueira, M. A., & Cardoso, E. J. B. N. (2002). Interações microbianas na disponibilidade e absorção de manganês por soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37, 1605-1612.

Nogueira, M. A., Magalhães, G. C., & Cardoso, E. J. (2004). Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. *Journal of Plant Nutrition*, 27(1), 141-156.

Nogueira, M. A., Magalhães, G. C., & Cardoso, E. J. (2004). Manganese toxicity in mycorrhizal and phosphorus-fertilized soybean plants. *Journal of Plant Nutrition*, 27(1), 141-156.

Nogueira, M. A., Nehls, U., Hampp, R., Poralla, K., & Cardoso, E. J. B. N. (2007). Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. *Plant and Soil*, 298, 273-284.

Ohtomo, R., & Saito, M. (2005). Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 167(2), 571–578.

Oliveira, J., Yildirim, G., & Corradi, N. (2024). From chaos comes order: Genetics and genome biology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 78.

Olsson, P. A., & Johansen, A. (2000). Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research*, 104(4), 429-434.

Pánková, H., Lepinay, C., Rydlová, J., Voříšková, A., Janoušková, M., Dostálek, T., & Münzbergová, Z. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbial communities from dry grassland do not improve plant growth on abandoned field soil. *Oecologia*, 186, 677-689.

Paries, M., & Gutjahr, C. (2023). The good, the bad, and the phosphate: regulation of beneficial and detrimental plant–microbe interactions by the plant phosphate status. *New Phytologist*, 239(1), 29-46.

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 763-775.

Pearson, J. N., Smith, S. E., & Smith, F. A. (1991). Effect of photon irradiance on the development and activity of VA mycorrhizal infection in *Allium porrum*. *Mycological Research*, 95(6), 741-746.

Perner, H., Schwarz, D., Bruns, C., Mäder, P., & George, E. (2007). Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza*, 17, 469-474.

Pittman, J. K. (2005). Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytologist*, 167(3), 733-742.

Poletto, M., & Zattera, A. J. (2013). Materials produced from plant biomass: part III: degradation kinetics and hydrogen bonding in lignin. *Materials Research*, 16, 1065-1070.

Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., Cousins, B. G., & Pradhan, N. (2021). Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. *Chemosphere*, 274, 129976.

Qi, S., Wang, J., Wan, L., Dai, Z., da Silva Matos, D. M., Du, D., ... & Moles, A. T. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorous uptake and allocation strategies of

Solidago canadensis in a phosphorous-deficient environment. *Frontiers in Plant Science*, 13, 831654.

Rafi, S., Shoaib, A., Awan, Z. A., Rizvi, N. B., Nafisa, & Shafiq, M. (2017). Chromium tolerance, oxidative stress response, morphological characteristics, and FTIR studies of phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Folia microbiologica*, 62, 207-219.

Ran, Q., Dong, C., Zhang, Q., Shao, Q., Zhang, Y., Long, X., & Han, Y. (2024). Seed endophytes reshape rhizosphere microbiota to promote the growth of *Eucommia ulmoides* seedlings. *Applied Soil Ecology*, 201, 105487.

Recorbet, G., Rogniaux, H., Gianinazzi-Pearson, V., & DumasGaudot, E. (2009). Fungal proteins in the extra-radical phase of arbuscular mycorrhiza: a shotgun proteomic picture. *New Phytologist*, 248-260.

Riaz, M., Kamran, M., Fang, Y., Wang, Q., Cao, H., Yang, G., ... & Wang, X. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced mitigation of heavy metal phytotoxicity in metal contaminated soils: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123919.

Richards, A., Veses, V., & Gow, N. A. (2010). Vacuole dynamics in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 24(3-4), 93-105.

Riley, R., & Corradi, N. (2013). Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, 6(1), 44–49.

Riley, R., Charron, P., Idnurm, A., Farinelli, L., Dalpé, Y., Martin, F., & Corradi, N. (2014). Extreme diversification of the mating type–high-mobility group (MATA-HMG) gene family in a plant-associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 201(1), 254-268.

Rillig, M. C., & Steinberg, P. D. (2002). Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification?. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(9), 1371-1374.

Robinson, J. R., Isikhuemhen, O. S., & Anike, F. N. (2021). Fungal–metal interactions: A review of toxicity and homeostasis. *Journal of Fungi*, 7(3), 225.

Rodriguez, A., & Sanders, I. R. (2015). The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *The ISME journal*, 9(5), 1053-1061.

Roitsch, T., & González, M. C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in plant science*, 9(12), 606-613.

Ropars, J., Toro, K. S., Noel, J., Pelin, A., Charron, P., Farinelli, L., ... & Corradi, N. (2016). Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature microbiology*, 1(6), 1-9.

Ros, M. B. H., Koopmans, G. F., van Groenigen, K. J., Abalos, D., Oenema, O., Vos, H. M. J., & van Groenigen, J. W. (2020). Towards optimal use of phosphorus fertiliser. *Scientific Reports*, 10(1).

Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. In *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 50–56.

Roth, R., Hillmer, S., Funaya, C., Chiapello, M., Schumacher, K., lo Presti, L., Kahmann, R., & Paszkowski, U. (2019). Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nature Plants*, 5(2), 204–211.

Ruan, Y. L., Jin, Y., Yang, Y. J., Li, G. J., & Boyer, J. S. (2010). Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3(6), 942-955.

Ruotsalainen, A. L., Kauppinen, M., Wäli, P. R., Saikkonen, K., Helander, M., & Tuomi, J. (2022). Dark septate endophytes: mutualism from by-products? In *Trends in Plant Science*, 27(3), 247–254.

Saha, H., Kaloterakis, N., Harvey, J. A., van der Putten, W. H., & Biere, A. (2022). Effects of Light Quality on Colonization of Tomato Roots by AMF and Implications for Growth and Defense. *Plants*, 11(7).

Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., Pozo, M. J., & Chávez-Bárcenas, A. T. (2021). An updated review on the

modulation of carbon partitioning and allocation in arbuscular mycorrhizal plants. *Microorganisms*, 10(1), 75.

Salmeron-Santiago, I. A., Martínez-Trujillo, M., Valdez-Alarcón, J. J., Pedraza-Santos, M. E., Santoyo, G., López, P. A., ... & Chávez-Bárcenas, A. T. (2023). Carbohydrate and lipid balances in the positive plant phenotypic response to arbuscular mycorrhiza: increase in sink strength. *Physiologia Plantarum*, 175(1), e13857.

Samreen, T., Naveed, M., Nazir, M. Z., Asghar, H. N., Khan, M. I., Zahir, Z. A., ... & Choudhary, M. (2021). Seed associated bacterial and fungal endophytes: Diversity, life cycle, transmission, and application potential. *Applied Soil Ecology*, 168, 104191.

Sanchez, P. A., & Logan, T. J. (1992). Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics. *Myths and Science of Soils of the Tropics*, 29, 35-46.

Sarathambal, C., Srinivasan, V., Jeevalatha, A., Sivaranjani, R., Alagupalamuthirsolai, M., Peeran, M. F., ... & Dilkush, F. (2024). Unravelling the synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on improving plant growth, nutrient absorption, and secondary metabolite production in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1412610.

Sawka, A., & Nakashima, H. (2004). Endophyte transmission via seeds of *Lolium perenne* L.: immunodetection of fungal antigens. *Fungal Genetics and Biology*, 41(5), 534-541.

Schaarschmidt, S., Roitsch, T., & Hause, B. (2006). Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of experimental botany*, 57(15), 4015-4023.

Scheloske, S., Maetz, M., Schneider, T., Hildebrandt, U., Bothe, H., & Povh, B. (2004). Element distribution in mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of the halophyte *Aster tripolium* determined by proton induced X-ray emission. *Protoplasma*, 223, 183-189.

Schmitz, A. M., & Harrison, M. J. (2014). Signaling events during initiation of arbuscular mycorrhizal symbiosis. In *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 250–261.

Schneider, J., Bundschuh, J., & do Nascimento, C. W. A. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted phytoremediation of a lead-contaminated site. *Science of The Total Environment*, 572, 86-97.

Serghi, E. U., Kokkoris, V., Cornell, C., Dettman, J., Stefani, F., & Corradi, N. (2021). Homo-and dikaryons of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differ in life history strategy. *Frontiers in plant science*, 12, 715377.

Shapaval, V., Afseth, N. K., Vogt, G., & Kohler, A. (2013). Fourier transform infrared spectroscopy for the prediction of fatty acid profiles in *Mucor* fungi grown in media with different carbon sources. *Microbial cell factories*, 13, 1-11.

Shapaval, V., Deniset-Besseau, A., Dubava, D., Dzurendova, S., Heitmann Solheim, J., & Kohler, A. (2023). Multiscale spectroscopic analysis of lipids in dimorphic and oleaginous *Mucor circinelloides* accommodate sustainable targeted lipid production. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1), 2.

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.

Sims, L., Pastor, J., Lee, T., & Dewey, B. (2012). Nitrogen, phosphorus and light effects on growth and allocation of biomass and nutrients in wild rice. *Oecologia*, 170, 65-76.

Singh, C. B., Jayas, D. S., Borondics, F., & White, N. D. G. (2014). Synchrotron based infrared imaging study of compositional changes in stored wheat due to infection with *Aspergillus glaucus*. *Journal of Stored Products Research*, 47(4), 372–377.

Singla, S., Htut, K. Z., Zhu, R., Davis, A., Ma, J., Ni, Q. Z., ... & Dhinojwala, A. (2021). Isolation and characterization of allomelanin from pathogenic black knot fungus— a sustainable source of melanin. *ACS omega*, 6(51), 35514-35522.

Skotti, E., Kountouri, S., Bouchagier, P., Tsitsigiannis, D. I., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). FTIR spectroscopic evaluation of changes in the cellular biochemical composition of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* induced by extracts of some Greek

medicinal and aromatic plants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 127, 463-472.

Smith, S., & Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* third Edition introduction. *Mycorrhizal Symbiosis*, 1-9.

Smith, S. E., Smith, F. A., & Jakobsen, I. (2004). Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New phytologist*, 162(2), 511-524.

Smith, S. E., Jakobsen, I., Grønlund, M., & Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant physiology*, 156(3), 1050-1057.

Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., & Stajich, J. E. (2016a). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046.

Strullu-Derrien, C., Selosse, M. A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. In *New Phytologist*, 220(4), 1012–1030.

Sturm, A., Hess, D., Lee, H. S., & Lienhard, S. (1999). Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiologia plantarum*, 107(2), 159-165.

Sugiura, Y., Akiyama, R., Tanaka, S., Yano, K., Kameoka, H., Marui, S., ... & Saito, K. (2020). Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25779-25788.

Suppi, I. M., Campos, M. L., Miquelluti, D. J., & Bueno, D. K. (2018). Cobalt and manganese content in soils of Santa Catarina. *Revista de Ciencias Agroveterinarias*, 17(4), 579–588.

Szeghalmi, A., Kaminskyj, S., & Gough, K. M. (2007). A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5), 1779–1789.

Tedersoo, L., Bahram, M., & Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367, 6480.

Trewin, N. H., & Rice, C. M. (2004). The Rhynie hot-spring system: geology, biota and mineralisation. Edinburgh: Royal Society of Edinburgh, 246.

Trouvelot, A., Gianinazzi, S. & Pearson, V. G., (1986). Que peut-on attendre des mycorhizes dans la production des arbres fruitiers?. *Fruits*, 41(9), 553-556.

van der Heijden, M. G. A., & Horton, T. R. (2009). Socialism in soil? the importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology*, 97(6), 1139–1150.

Vaz, J., & Sharma, P. K. (2009). Photoinhibition and photosynthetic acclimation of rice (*Oryza sativa* L. cv Jyothi) plants grown under different light intensities and photoinhibited under field conditions.

Venegas-Rioseco, J., Ginocchio, R., & Ortiz-Calderón, C. (2021). Increase in phytoextraction potential by genome editing and transformation: a review. *Plants*, 11(1), 86.

Verma, S. K., Sahu, P. K., Kumar, K., Pal, G., Gond, S. K., Kharwar, R. N., & White, J. F. (2021). Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2161-2177.

Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12).

Vos, C. M., Tesfahun, A. N., Panis, B., de Waele, D., & Elsen, A. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode

Meloidogyne incognita and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology*, 61, 1–6.

Walder, F., & Van Der Heijden, M. G. (2015). Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature plants*, 1(11), 1-7.

Wang, Y. J., & Wu, Q. S. (2023). Influence of sugar metabolism on the dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and plants. *Horticulture Advances*, 1(1), 2.

Wang, F., Zhang, L., Zhou, J., Rengel, Z., George, T. S., & Feng, G. (2023). Exploring the secrets of hyphosphere of arbuscular mycorrhizal fungi: processes and ecological functions. *In Plant and Soil*, 481(1–2), 1–22.

Wang, H., Wen, K., Zhao, X., Wang, X., Li, A., & Hong, H. (2009). The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop protection*, 28(8), 634-639.

Wipf, D., Krajinski, F., van Tuinen, D., Recorbet, G., & Courty, P. E. (2019). Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. *In New Phytologist*, 223(3), 1127–1142.

Witkowski, E. T. F., & Lamont, B. B. (1991). Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, 88, 486-493.

Wu, Q. S. (Ed.). (2017). *Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants*. Springer.

Yemm, E. W., & Willis, A. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical journal*, 57(3), 508.

York, L. M., Carminati, A., Mooney, S. J., Ritz, K., & Bennett, M. J. (2016). The holistic rhizosphere: Integrating zones, processes, and semantics in the soil influenced by roots. *In Journal of Experimental Botany*, 67(12), 3629–3643.

Zasoski, R. J., & Bureau, R. G. (1977). A rapid nitric-perchloric acid digestion method for multi-element tissue analysis. *Communications in soil science and plant analysis*, 8(5), 425-436.

Zhang, H., Wei, S., Hu, W., Xiao, L., & Tang, M. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* increased potassium content and expression of genes encoding potassium channels in *Lycium barbarum*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 440.

Zhang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, H., & Tang, M. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi alter carbohydrate distribution and amino acid accumulation in *Medicago truncatula* under lead stress. *Environmental and Experimental Botany*, 171.

Zhang, H., Wen, S. H., Li, P. H., Lu, L. Y., Yang, X., Zhang, C. J., ... & Zhu, X. Q. (2024). LysM protein BdLM1 of *Botryosphaeria dothidea* plays an important role in full virulence and inhibits plant immunity by binding chitin and protecting hyphae from hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1320980.

Zhu, X. Q., Wang, C. Y., Chen, H., & Tang, M. (2013). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, carbon content, and calorific value of black locust seedlings. *Photosynthetica*, 52(2), 247-252.

Zhu, X. Q., Wang, C. Y., Chen, H., & Tang, M. (2014). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, carbon content, and calorific value of black locust seedlings. *Photosynthetica*, 52(2), 247-252.

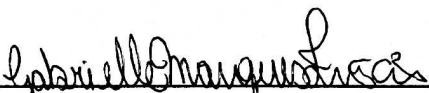
Zhu, H., Li, X., Zhai, W., Liu, Y., Gao, Q., Liu, J., ... & Zhu, Y. (2017). Effects of low light on photosynthetic properties, antioxidant enzyme activity, and anthocyanin accumulation in purple pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *Chinensis* Makino). *PLoS One*, 12(6), e0179305.

Zou, Y. N., Wu, Q. S., & Kuča, K. (2021). Unravelling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. In *Plant Biology*, 23(S1), 50–57.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR SOB ESTRESSE: ANÁLISE COMPOSICIONAL DE HIFAS EXTRARRADICULARES POR MICROESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 28 de abril de 2025

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): Gabrielle Marques Inácio
RG n.º 18.203.970

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): ~~Sara Adrián López de Andrade~~
RG n.º

Prof.ª Dr.ª Sara Adrián L. Andrade
Departamento Biologia Vegetal / IB
Matrícula Unicamp 308205



UNICAMP

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada **"SIMBIOSE MICORRÍZICA ARBUSCULAR SOB ESTRESSE: ANÁLISE COMPOSICIONAL DE HIFAS EXTRARRADICULARES POR MICROESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Gabrielle Marques Inácio
Nome do(a) aluno(a): Gabrielle Marques Inácio

Assinatura: Sara Adrián López de Andrade
Nome do(a) orientador(a): Sara Adrián López de Andrade

Prof.ª Dr.ª Sara Adrián L. Andrade
Departamento Biologia Vegetal 3
Marília, SP, Brasil 13062-000

Data: 28/04/2025